

## BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



REC'D 18 SEP 2000

WIPO

PCT

DE 00/02596

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung

4

PRIORITY  
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Aktenzeichen:

199 39 653.1

Anmeldetag:

13. August 1999

Anmelder/Inhaber:

Professor Dr. Thomas H ü n i g, Würzburg/DE

Bezeichnung:

Verwendung CD28 spezifischer monoklonaler Anti-  
körper zur Herstellung einer pharmazeutischen Zu-  
sammensetzung

IPC:

A 61 K 39/42

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.München, den 06. September 2000  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Hoß



DE-Patentanmeldung

Dipl.-Ing. Hans Albrecht  
Patentanwalt (1933 - 1979)

Dipl.-Ing. Dierck-Wilm Lücke  
Patentanwalt / European Patent Attorney /  
European Trademark Attorney

Dipl.-Chem. Dr. Bernhard Jungblut  
Patentanwalt / European Patent Attorney /  
European Trademark Attorney

Anwaltsakte: UNW/DE/9903

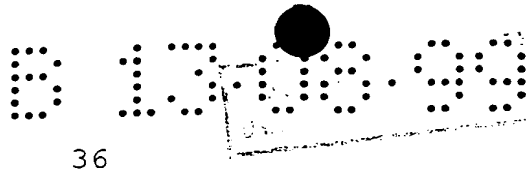
Datum: 12.08.99

Anmelder: Prof. Dr. Thomas HÜNIG  
Mittlere Heerbergstr. 26  
D-97078 Würzburg

Titel: Verwendung CD28 spezifischer monoklonaler Antikörper zur  
Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung.

Erfinder: Prof. Dr. Thomas HÜNIG, Mittlere Heerbergstr. 26, D-97078  
Würzburg

Priorität: -----



36

### Zusammenfassung

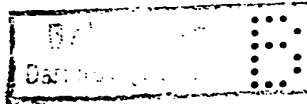
Die Erfindung lehrt die Verwendung monoklonaler Antikörper, welche für CD28 spezifisch sind und T-Lymphozyten mehrerer 5 bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines Antigenrezeptors der T-Lymphozyten und somit antigenunspezifisch aktivieren, oder eines Analogens hierzu zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung in der Ausführungsform als Präparat oder Präparatepaket zur Behandlung von Virusinfektionen beim 10 Menschen oder niedrigeren Warmblütern, bei welchen T-Lymphozyten infiziert sind, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung zusätzlich einen Virus Inhibitor enthält, eine entsprechend pharmazeutische Zusammensetzung und einen Behandlungsplan unter Verwendung der pharmazeutischen 15 Zusammensetzung.

20

25

30

35



10.08.99

## Verwendung CD28 spezifischer monoklonale Antikörper zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung

### 5 Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft die Verwendung monoklonaler Antikörper, welche für CD28 spezifisch sind und T-Lymphozyten mehrerer bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines

10 Antigenrezeptors der T-Lymphozyten und somit antigenunspezifisch aktivieren, oder ein Analog hierzu, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung in der Ausführungsform als Präparat oder Präparatepaket zur Behandlung von Virusinfektionen beim Menschen oder niedrigeren Warmblütern, bei  
15 welchen T-Lymphozyten infiziert sind, eine Paketkomponente mit solchen Antikörpern oder Analogen, ein Verfahren zur Behandlung von Virusinfektionen unter Verwendung einer solchen Zusammensetzung und einen Behandlungsplan unter Verwendung einer solchen Zusammensetzung.

20

### Hintergrund der Erfindung

Das HIV durchläuft einen Lebenszyklus, in welchem es in verschiedenen Latenzstadien vorliegen kann. Ein erstes Latenzstadium wird als präintegrativ bezeichnet und meint, daß  
25 das HIV zwar in die Wirtszelle importiert und ggf. zumindest teilweise der reversen Transkription unterzogen, jedoch nicht in den Zellkern als Provirus eingebaut ist. Dieses präintegrative Latenzstadium kann latent funktional bleiben über  
30 eine Mehrzahl von Wochen bis zur Einbüßung der Funktionsfähigkeit. Die präintegrative Latenz erfordert, daß die Wirtszelle ruht. Ein weiteres Latenzstadium wird als postintegrativ bezeichnet und meint, daß das HIV als Provirus zwar in den Zellkern integriert worden ist, die Wirtszelle jedoch  
35 beispielsweise aufgrund von Deaktivierung ruht und folglich

keine Virusreplikation stattfindet. Die postintegrative Latenz ist vergleichsweise langzeitstabil und hält bis zu einer Aktivierung der Wirtszelle an. Eine Aktivierung von latentem (post- oder präintegrativ) HIV enthaltenden Wirtszellen erfolgt durch verschiedene Stimuli mit der Folge der Aktivierung auch der Virusreplikation, wobei die Wirtszelle zerstört und Virus in die Körperflüssigkeit freigesetzt wird. Die vorstehenden Erläuterungen gelten grundsätzlich für alle Retroviren. Virus in einem latenten Stadium wird folgend Latenzvirus genannt.

Bisherige Therapieansätze mit Reverse Transkriptase Inhibitoren und ggf. Protease Inhibitoren unterdrücken die Virusvermehrung nach Aktivierung des Latenzvirus. Somit verschwindet zwar freies HIV unter Therapie aus der Zirkulation, ruhende Leukozyten enthalten jedoch weiterhin Latenzvirus (T.W. Chun et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:13193-13197 (1997); D. Finzi et al., Science, 278:1295-1300 (1997); J.K. Wong et al., Science, 278:1291-1295 (1997)). Die Folge ist ein Wiedererscheinen replikationsfähiger Viren bei Unterbrechung der Therapie (M.D. de Jong et al., AIDS, 11:F79-84 (1997)) und Fortschreiten der Erkrankung. Die Therapie mit Reverse Transkriptase Inhibitoren und ggf. Protease Inhibitoren ist jedoch toxisch und eine insofern notwendige lebenslange Behandlung hat daher ihre Grenzen bzw. Bedenken. Zudem ist die Behandlung mit Reverse Transkriptase Inhibitoren und ggf. Protease Inhibitoren mit beachtlichen Kosten verbunden.

30

Stand der Technik

Als Konsequenz aus der vorstehenden grundsätzlichen Problematik wurde vorgeschlagen, latentes HIV der Therapie mit Reverse Transkriptase Inhibitoren und Protease Inhibitoren

35

durch gleichzeitige Behandlung mit immunstimulierenden Agentien, die das latente HIV aktivieren, zugänglich zu machen ("flush out"; O.J. Cohen et al., J. Am. Med. Assoc., 280:87-88 (1998); J. Cohen, Science, 279:1854-1855 (1998);  
5 D.D. Ho, Science, 280:1866-1867 (1998); L.K. Schrager et al., J. Am. Med. Assoc., 280:67-71 (1998)). Konkret zeigt die Literaturstelle T.W. Chun et al., Nature Medicine, Volume 5, Number 6, pp. 651-655 (1999), daß durch Einsatz des T-Zellwachstumsfaktors Interleukin 2 (IL-2) zusammen mit der  
10 HAART Therapie (siehe hierzu unten) eine signifikante Reduktion der Menge an replikationskompetentem HIV in den ruhenden T-Lymphozyten gefunden wird. Allerdings exprimiert der größte Teil ruhender CD4 T-Lymphozyten keine Rezeptoren für den Wachstumsfaktor IL-2. Diese Zellen und damit das darin enthaltene latente HIV können deshalb durch die Darreichung von  
15 IL-2 nicht erreicht werden. Die grundsätzliche vorstehende Problematik bleibt daher bestehen und ist allenfalls geringfügig abgemildert. Hinzu kommt, daß die Darreichung von IL-2 mit beachtlich störenden Nebenwirkungen verbunden ist, welche  
20 den Erfolg dieser Strategie noch weiter relativieren.

Die verbreitetste Therapie unter Verwendung von Reverse Transkriptase Inhibitoren ist die HAART Therapie ("hochaktive anti-retrovirale Therapie"). Diese besteht in der kombinierten  
25 Anwendung von zwei Reverse Transkriptase Inhibitoren, z.B. die Nukleosidanaloge AZT (bzw. Zidovudine) und 3TC (bzw. Lamivudine), zusammen mit einem oder mehreren Protease Inhibitoren. Ein Beispiel für einen Protease Inhibitor ist IDV (Indinavir). Bezüglich der HAART Therapie, der darin verwendeten Substanzen und des Behandlungsplans wird auf die folgenden Literaturstellen verwiesen: J. Laurence, HAART  
30 Regiments: Do the effects last? in The AIDS Reader 7(6):84-85 (1997); R.M. Gulick et al., N. Engl. J. Med., 337:734-739 (1997); S.M. Hammer et al., N. Engl. J. Med., 337:725-733  
35 (1997); und F.J. Jr. Palella et al., N. Engl. J. Med.,

338:853-860 (1998). Weitere Beispiele für geeignete Reverse Transkriptase Inhibitoren sind die Nukleosidanalogue d4T (Stavudine), ddI (Didanosine) und ddC (Zalcitabine) sowie die nicht-Nukleosidanalogue DLV (Delavirdine) und NVP (Nevirapine). Weitere Beispiele für geeignete Protease Inhibitoren sind NFV (Nelfinavir), RTV (Ritonavir) und SQV (Saquinavir).

Aus der Literaturstelle WO 98/54225 sind humanverträgliche monoklonale Antikörper, welche für Human-CD28 spezifisch sind und Human-T-Lymphozyten mehrerer bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines Antigenrezeptors der Human-T-Lymphozyten und somit antigenunspezifisch aktivieren, bekannt. Bezüglich weiterer Hintergrundinformation wird auf die in dieser Literaturstelle genannten Zitate verwiesen. Aus dieser Literaturstelle ist es auch bekannt, diese monoklonalen Antikörper zur Behandlung von Erkrankungen mit pathologisch erniedrigten CD4-T-Zellzahlen, wie beispielsweise AIDS, zu verwenden. Hintergrund dieser Verwendung ist, daß mittels dieser Antikörper die CD4-T-Zellzahlen wieder angehoben werden können. Eine Verbindung mit der Darreichung von Reverse Transkriptase Inhibitoren und ggf. Protease Inhibitoren ist nicht gezogen. Die Literaturstelle WO 98/54225 wird hiermit ausdrücklich vollumfänglich in Bezug genommen.

25

#### Aufgabe der Erfindung

Gegenüber dem nächstliegenden Stand der Technik gemäß T.W. Chun et al., Nature Medicine, Volume 5, Number 6, pp. 651-655, liegt der Erfindung das technische Problem zugrunde, eine pharmazeutische Zusammensetzung bzw. einen Behandlungsplan zu entwickeln, womit einerseits zumindest der größte Teil der HIV Latenzviren, wenn nicht alle, aktiviert (und damit durch Virus Inhibitoren hemmbar und letztlich

35

zerstörbar gemacht) wird und andererseits die Nebenwirkungen reduziert werden.

## 5 Grundzüge der Erfindung

Die Erfindung lehrt die Verwendung monoklonaler Antikörper, welche für CD28 spezifisch sind und T-Lymphozyten mehrerer bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines Antigenrezeptors der T-Lymphozyten und somit antigenunspezifisch aktivieren, oder ein Analog hierzu, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung in der Ausführungsform als Präparat oder Präparatepaket zur Behandlung von Virusinfektionen beim Menschen oder niedrigeren Warmblütern, bei welchen T-Lymphozyten infiziert sind, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung zusätzlich einen Virus Inhibitor enthält. Es versteht sich, daß die Wirkstoffkomponenten in pharmazeutisch wirksamen Dosen eingesetzt werden.

Die Erfindung lehrt weiterhin eine pharmazeutische Zusammensetzung in einer Ausführungsform als Präparat oder als Präparatepaket, mit pharmazeutisch wirksamen Dosen der folgenden Wirkstoffkomponenten: a) vorzugsweise humanverträglichen monoklonalen Antikörpern, welche für CD28, vorzugsweise Human-CD28 spezifisch sind und T-Lymphozyten, vorzugsweise Human-T-Lymphozyten, mehrerer bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines Antigenrezeptors der T-Lymphozyten und somit antigenunspezifisch aktivieren, oder einem Analog hierzu, b) einem Virus Inhibitor, vorzugsweise einem Reverse Transkriptase Inhibitor, c) optional einem von b) verschiedenen Reverse Transkriptase Inhibitor, d) optional einem Protease Inhibitor, e) optional einem von d) verschiedenen Protease Inhibitor. Neben den vorstehenden Wirkstoffkomponenten können noch weitere Wirkstoffe und/oder für die galenische Herstellung zweckmäßige oder notwendige Stoffe enthalten sein.



Die Erfindung lehrt weiterhin eine Paketkomponente eines erfindungsgemäßen Präparatepakets enthaltend die Wirkstoffkomponente a).

5

Die Erfindung lehrt weiterhin ein Verfahren zur Behandlung von Virusinfektionen mit Lentivirus, insbesondere HIV, wobei eine erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung einem von der Virusinfektion befallenen menschlichen Körper oder  
10 einem Körper eines niedrigeren Warmblüters dargereicht wird, bzw. ein Verfahren zur Behandlung von Virusinfektionen mit Lentivirus, insbesondere HIV, wobei einem menschlichen Körper oder einem Körper eines niedrigeren Warmblüters folgende Wirkstoffkomponenten in pharmazeutisch wirksamer Dosis  
15 dargereicht werden: a) vorzugsweise humanverträgliche monoklonale Antikörper, welche für CD28, vorzugsweise Human-CD28, spezifisch sind und T-Lymphozyten, vorzugsweise Human-T-Lymphozyten, mehrerer bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines Antigenrezeptors der T-Lymphozyten und somit antigenun-  
20 spezifisch aktivieren, oder ein Analog hierzu, b) ein Virus Inhibitor, vorzugsweise ein Reverse Transkriptase Inhibitor, c) optional ein von b) verschiedener Reverse Transkriptase Inhibitor, d) optional ein Protease Inhibitor, e) optional ein von d) verschiedener Protease Inhibitor.

25

Die Erfindung lehrt schließlich die Verwendung eines vorzugsweise humanverträglichen monoklonalen Antikörpers a), welcher für CD28, vorzugsweise Human-CD28, spezifisch ist und T-Lymphozyten, vorzugsweise Human-T-Lymphozyten, mehrerer bis  
30 aller Untergruppen ohne Besetzung eines Antigenrezeptors der T-Lymphozyten und somit antigenunspezifisch aktiviert, oder eines Analogen hierzu, und eines Virus Inhibitors b), vorzugsweise eines Reverse Transkriptase Inhibitors, in Form einer Mischung oder von räumlich getrennten Zusammensetzungen, von  
35 denen die eine die Wirkstoffkomponente a) und die andere die

Wirkstoffkomponente b) enthält, als Mittel zur Anwendung bei der Behandlung von Virusinfektionen mit Lentiviren, insbesondere AIDS, bei Menschen oder niedrigeren Warmblütern nach einem Behandlungsplan, der einen oder mehrere Zyklen umfaßt, wobei der Behandlungsplan aus folgenden Schritten besteht: i) zunächst wird die Wirkstoffkomponente b) in einer pharmazeutisch wirksamen Dosis dargereicht, ii) nach einer vorgegebenen Dauer der Stufe i) wird die Wirkstoffkomponente a) in einer pharmazeutisch wirksamen Dosis dargereicht bei fort- fahrender Darreichung der Wirkstoffkomponente b), iii) optional wird Stufe ii) nach einer vorgegebenen Ruhepause bei fortzufahrender Darreichung der Wirkstoffkomponente b) einmal oder mehrmals wiederholt. Im Rahmen dieser Verwendung kann der Stufe i) eine Darreichung der Wirkstoffkomponente a) vorgeschaltet sein.

Die Erfindung beruht zunächst auf der Erkenntnis, daß durch die Aktivierung eines Großteils der T-Lymphozyten auch ruhendes (Latenz-) Virus aktiviert und so durch Virus Inhibitoren, insbesondere Reverse Transkriptase Inhibitoren (und/oder Protease Inhibitoren), zerstörbar gemacht wird. Hieran anschließend beruht die Erfindung auf der weiteren überraschenden Erkenntnis, daß die parallele Anwendung von (toxischen) Reverse Transkriptase Inhibitoren, beispielsweise der (toxischen) HAART Therapie, die Aktivierung der T-Lymphozyten nicht konterkariert. Dies hat im Ergebnis eine doppelte Bedeutung und folglich synergistische Wirkung. Einerseits ist so die Aktivierung des Großteils der T-Lymphozyten trotz paralleler HAART Therapie mit der Folge der Vernichtung praktisch des gesamten Latenzvirus-Reservoirs durch die HAART Therapie gewährleistet. Andererseits wird gleichzeitig die ohnehin pathologisch erniedrigte Anzahl der T-Lymphozyten wieder angehoben mit der Folge einer Stabilisierung des Immunsystems. Hinzu kommt noch, daß mit den erfindungsgemäßen Mitteln vermutlich auch nicht-T-Zell

Reservoirs für Latenzviren (z.B. Makrophagen) indirekt durch die starke generelle Stimulierung des Immunsystems bzw. der T-Zellen mit der entsprechenden Zytokinfreisetzung aktiviert werden und so auch diese Latenzviren aktiviert und zerstört werden können; eine weitere Synergie.

Letztendlich wird erreicht, daß nicht nur das freie Virus praktisch vollständig ausgeschaltet wird, sondern auch praktisch das ganze Latenzvirus Reservoir durch Aktivierung der Zerstörung zugänglich gemacht wird. Dadurch braucht die HAART Therapie nicht mehr lebenslang, zumindest jedoch nur noch in sehr großen Zeitabständen, eingesetzt zu werden. Ein weiterer überraschender Vorteil gegenüber dem nächstliegenden Stand der Technik ist, daß die erfindungsgemäß eingesetzten Antikörper nach ersten Untersuchungen in Tiermodellen keine Nebenwirkungen zu erzeugen scheinen. Insgesamt wird eine wesentlich effektivere Ausschaltung des Virus in Verbindung mit einer beachtlich verbesserten Befindlichkeit des Patienten bereits während der Therapie erreicht.

20

In diesen Zusammenhängen mag angemerkt werden, daß mit den erfindungsgemäß eingesetzten monoklonalen Antikörpern in der Tat sämtliche CD4 T-Zellen zur Proliferation angeregt werden können. Nur eine Subpopulation von CD8 T-Lymphozyten, die CD28 nicht exprimieren, kann nicht durch aktivierende CD28-spezifische Reagenzien aktiviert werden. Allerdings stellt diese auch kein wesentliches Reservoir von HIV dar, da der primäre Rezeptor für HIV das CD4 Molekül ist.

30

#### Definitionen

Als monoklonale Antikörper sind Antikörper bezeichnet, die von Hybrid-Zelllinien (sog. Hybridomen) produziert werden, die durch Fusion einer Antikörper produzierenden B-Zelle

tierischer oder menschlicher Herkunft mit einer geeigneten Myelom Tumorzelle entstanden sind. Im Rahmen dieser Beschreibung sind mit dem Ausdruck der monoklonalen Antikörper auch deren Derivate umfaßt.

5

Als CD28 wird ein auf T-Lymphozyten menschlicher und tierischer Herkunft exprimiertes Zelloberflächenmolekül bekannter Aminosäuresequenz bezeichnet, dem im Rahmen der internationalen "Human Leukocyte Typing Workshops" das Kürzel  
10 CD28 gegeben wurde.

Mit Aktivierung von T-Lymphozyten ist die Vermehrung der Stoffwechselaktivität, Vergrößerung des Zellvolumens, Synthese immunologisch wichtiger Moleküle und Eintritt in die  
15 Zellteilung (Proliferation) von T-Lymphozyten auf einen äußeren Reiz hin gemeint. Beispielsweise werden diese Vorgänge durch Besetzung des CD28-Moleküls auf T-Zellen durch besondere CD28-spezifische monoklonale Antikörper ausgelöst. Die Aktivierung von T-Lymphozyten mit den beschriebenen  
20 Begleiterscheinungen ist Teil der physiologischen Immunreaktion, kann dort aber in pathologischen Situationen außer Kontrolle geraten (lymphoproliferative Erkrankungen), oder unzureichend sein (Immundefizienz).

25 Konstante Komponenten eines Antikörpers sind Bereiche, die nicht für die Antigenerkennung bedeutsam sind, im Gegensatz zu den variablen Bereichen, die die Antigenspezifität eines Antikörpers definieren. Konstante Komponenten unterscheiden sich jedoch bei Antikörpern verschiedener Arten und folglich  
30 auch Tieren und Menschen. Die konstanten Bereiche eines Antikörpers müssen jenen von Antikörpern eines Organismus entsprechen, der mit den Antikörpern behandelt werden soll, um verträglich zu sein.

Unter Derivaten von monoklonalen Antikörpern sind Modifikationen des monoklonalen Antikörpers zu verstehen, die durch übliche biochemische oder gentechnische Manipulationen erzeugt wurden. Dies ist beispielsweise gegeben mit der Humanisierung eines monoklonale Antikörpers der Maus durch partiellen Ersatz struktureller (konstanter) Komponenten des Maus-Antikörpers durch solche eines menschlichen. Derivate sind weiterhin monoklonale Antikörper, welche zwar chemisch verändert sind, jedoch dennoch die im Rahmen der Erfindung erläuterten Funktionen ausüben. Gemeinsames Kriterium ist stets die CD28 Spezifität mit stimulatorischem Effekt.

Analoge sind Substanzen, die keine monoklonalen Antikörper sind, jedoch die im Rahmen der Erfindung erläuterten Funktionen ausüben. Beispiele hierfür sind "geschneiderte" hochspezifische synthetische Proteine oder RNA bzw. DNA Moleküle (z.B. Aptamere, insbesondere gegen Nukleinsäurespaltende Enzyme stabilisierte Aptamere bzw. RNA oder DNA Moleküle). Gemeinsames Kriterium ist stets die CD28-Spezifität mit stimulatorischem Effekt.

Unter einer Determinante ist der Bereich eines Moleküls zu verstehen, der durch die Bindungsspezifität eines oder mehrerer Antikörper definiert wird.

25

Der Ausdruck der therapeutisch aktiven Dosis bezeichnet im Zusammenhang mit Virus Inhibitoren, beispielsweise Reverse Transkriptase Inhibitoren (und ggf. Protease Inhibitoren), eine Dosis, die zu einer signifikanten Verringerung der Menge an replikationsfähigem Virus ab einem definierten Zeitraum nach Darreichung der Virus Inhibitoren an einen Patienten oder in einem Testsystem führt, verglichen mit der Menge an replikationsfähigem Virus nach gleichem Zeitraum und gleicher Anfangsmenge an replikationsfähigem Virus, jedoch ohne irgendeine Darreichung.

35

Der Ausdruck der therapeutisch aktiven Dosis bezeichnet im Zusammenhang mit erfindungsgemäß eingesetzten Antikörpern eine Dosis, die zu einer signifikanten Erhöhung der CD4 T-  
5 Zellzahlen und/oder der Expression von serologisch nachweisbaren Aktivierungsmarkern (CD25, CD45RO, CD71) nach einem definierten Zeitraum in einem Organismus oder Testsystem, welchem die Antikörper dargereicht wurden, verglichen mit respektiven Werten nach gleichem Zeitraum und gleicher An-  
10 fangswerte, jedoch ohne irgendeine Darreichung.

Humanverträglich bezeichnet Antikörper, welche humanisiert sind. Es mag hier angemerkt werden, daß nicht humanisierte und folglich nicht unter die hier getroffene Definition der  
15 humanverträglichen Antikörper fallende Antikörper durchaus zur Therapie beim Menschen angewandt werden können. Bei der Therapie des Menschen können insofern alle Antikörper eingesetzt werden, welche über einen bestimmten Zeitraum keine unerwünschten Immunreaktionen auslösen, wie beispielsweise  
20 durch Bestimmung von anti-Immunglobulin Antikörper als Abbruchkriterium nachweisbar.

Als Virus Inhibitor ist jeder Wirkstoff bezeichnet, welcher in eine beliebige Stufe des Lebenszyklus eines Virus direkt  
25 oder indirekt hemmend eingreift. Hierfür kommen neben Reverse Transkriptase Inhibitoren und Protease Inhibitoren beispielsweise auch Inhibitoren der Zelloberflächenrezeptoren in Frage, an welche ein Virus andockt, oder Inhibitoren aller positiv regulatorischen Proteine bzw. Prozesse eines Virus,  
30 einschließlich Inhibitoren zellulärer positiv regulatorischer Substanzen, welche auf die long terminal repeats eines Virus wirken. Grundsätzlich kommen auch Wirkstoffe in Frage, welche keine Inhibitoren sind, sondern negativ regulatorische Proteine bzw. Prozesse eines Virus induzieren; solche Wirkstoffe  
35 sind von dem Ausdruck Virus Inhibitor ebenfalls umfaßt.

Der Begriff der kontinuierlichen Darreichung einer Wirkstoffkomponente b) und/oder c) und/oder d) und/oder e) meint, daß ein zu dieser Komponente anzuwendender (in sich ggf. diskontinuierlicher) Behandlungsunterplan kontinuierlich 5 fortgeführt wird. Insofern schließt der Ausdruck der kontinuierlichen Darreichung beispielsweise bei der HAART Therapie auch ein Variation und individuelle Anpassung der Wirkstoffkomponenten bzw. deren Dosierung in Verfolg der kontinuierlichen Darreichung ein.

10

#### Detaillierte Darstellung der Erfindung

Folgend werden zweckmäßige oder bevorzugte Ausführungsformen 15 der Erfindung angegeben und näher erläutert.

Bevorzugt ist die erfindungsgemäße Verwendung zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Erkrankungen, wobei CD4 T-Lymphozyten, insbesondere Human-CD4 20 T-Lymphozyten, infiziert sind, wobei die monoklonalen Antikörper für Human-CD28 spezifisch sind und wobei die monoklonalen Antikörper optional humanverträglich sind. Bei der Behandlung von Infektionen von Human-CD4-Lymphozyten, also des Menschen, müssen die Antikörper Human-CD28 spezifisch 25 sein, nicht jedoch notwendigerweise humanverträglich. Die Erfindung ist beispielsweise anwendbar, wenn die Virusinfektion eine Infektion mit Retrovirus, insbesondere Lentivirus, beispielsweise HIV, ist.

30 Zweckmäßig ist es, wenn der Virus Inhibitor ein Reverse Transkriptase Inhibitor, vorzugsweise ein Pyrimidin-Nukleosidanalogue, höchstvorzugsweise 3'-Azido-3'-desoxythymidin (AZT oder Zidovudin), ist und optional weiterhin zusätzlich andere hiervon verschiedene Nukleosidanalogue, vor- 35 zugsweise 3TC, in der pharmazeutischen Zusammensetzung ent-

halten sind. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann zusätzlich einen Proteaseinhibitor enthalten und optional weiterhin zusätzlich andere, hiervon verschiedene Proteaseinhibitoren. Mit einer Wirkstoffkombination aus zumindest zwei Reverse Transkriptase Inhibitoren und optional zumindest einem Protease Inhibitor arbeitet die HAART Therapie.

Erfindungsgemäß eingesetzte monoklonale Antikörper sind auf die verschiedensten Weisen erhältlich. Eine verwendbare Ausführungsform gemäß der Ausführungsbeispiele ist erhältlich sind durch A) Herstellung von zur Produktion von monoklonalen Human-CD28 spezifischen Tier-Antikörpern befähigten Hybridomzellen im Wege einer Immunisierung mit nicht-T-Tumorzelllinien, auf welchen Human-CD28 exprimiert ist, B) ggf. Humanisierung der aus Hybridomzellen gemäß Stufe A erhältlichen monoklonalen Tier-Antikörper durch biochemischen oder gentechnologischen Austausch konstanter Komponenten der Tierantikörper gegen analoge konstante Komponenten eines menschlichen Antikörpers bzw. Austausch den Komponenten entsprechender Gene der Hybridomzellen, C) Sezernierung der monoklonalen Antikörper in Hybridomzell-Kulturen und Isolierung der monoklonalen Antikörper daraus oder Produktion der monoklonalen Antikörper durch Injektion der Hybridomzellen in Tiere, beispielsweise Mäuse, und Isolierung der monoklonalen Antikörper aus der Körperflüssigkeit der Tiere. Die zur Produktion von monoklonalen Human-CD28 spezifischen Tier-Antikörpern befähigten Hybridomzellen sind erhältlich durch a) Schaffung eines Plasmids mittels Insertion von Human-CD28 cDNA in den pHBAPr-1-neo Vector nach Excision des SalI-HindIII Fragments und Herstellung von Protoplasten aus Escherichia coli (MC1061), welche das Plasmid tragen, b) Fusionierung der Protoplasten mit Maus A20J und/oder L929 Tumorzellen mittels Polyethylenglykol, c) Kultivierung der in Stufe b erhaltenen transfektierten Zellen, d) Screenen der transfektierten Maus A20J und/oder L929 Zellen auf die



Expression von Human-CD28 und Selektion von Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen, e) Immunisierung von BALB/c Mäusen mit den Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen, f) Entnahme von Milzzellen der so immunisierten Mäuse und Fusionierung der Milzzellen mit Zellen der Zelllinie X63-Ag 8.653 mittels Polyethylenglykol, g) Selektierung der so erhaltenen Hybridomzellen mit der Maßgabe, daß im Überstand selektierter Hybridomzellen Antikörper enthalten sind, die an Human-CD28 exprimierende Maus A20J und/oder L929 Zellen binden und h) Kultivierung/Subclonierung der in Stufe g erhaltenen selektierten Hybridomzellen. Anstelle der Stufen a) bis d) können selbstverständlich aber auch andere dem Fachmann geläufige Expressionssysteme eingesetzt werden. Human-CD28 cDNA ist frei erhältlich von Dr. A. Aruffo und Dr. B. Seed, die die Sequenz und auch folgende Literaturstelle veröffentlicht haben: Aruffo, A., and Seed, B, 1987, "Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high efficiency COS cell expression system", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:8573. Dieser Literaturstelle ist daher im einzelnen die Herstellung der Human-CD28 cDNA entnehmbar. Darüberhinaus kann unschwer jeder Fachmann mit Hilfe der in der Genbank deponierten Sequenz und der Polymerasekettenreaktion sehr einfach und schnell einen Human-CD28 cDNA Klon herstellen. Der pH3APr-1-neo Vector ist frei erhältlich von den Autoren der Literaturstelle Gunning, P, et al., 1987, "A human  $\beta$ -actin expression vector system directs high-level accumulation of antisense transcripts", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:4831. "neo" steht dabei für Neomycin-Resistenz. Die Stufe c) wird daher in Anwesenheit von Neomycin durchgeführt. Die vorstehend angesprochenen Zelllinien und/oder Mikroorganismen sind frei verfügbar und käuflich erwerbbar bei der American Type Culture Collection (ATCC). Bezüglich Escherichia coli (MC1061) wird ergänzend auf die Literaturstelle Meissner, P.S., et al., 1987, "Bacteriophage gamma cloning system for

the construction of directional cDNA libraries", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:4171, verwiesen.

Die grundsätzliche Vorgehensweise bei der Herstellung von  
5 Hybridomzellen, bei der Humanisierung sowie bei der Produktion der monoklonalen Antikörper aus (humanisierten) Hybridomzellen ist dem Fachmann gut vertraut und braucht hier nicht näher erläutert zu werden. Grundsätzlich sind alle insbesondere für die Herstellung der Hybridomzellen üblichen,  
10 bekannten und frei verfügbaren Zelllinien einsetzbar. Zur Herstellung der monoklonalen Antikörper kommt grundsätzlich neben der folgend beschriebenen Vorgehensweise die dem Fachmann im Detail gut geläufige rekombinante Expression in Frage.

15 Einsetzbare monoklonale Antikörper sind aber auch auf anderen Wegen zugänglich. So kann beispielsweise die Immunisierung in Stufe A) gegen lösliches bzw. gelöstes rekombinantes Human-CD28 erfolgen. Die Humanisierung kann entbehrlich gemacht werden, indem bei der Herstellung der Hybridomzellen  
20 Tiere eingesetzt werden, die gentechnisch so verändert sind, daß die gebildeten Antikörper bereits die humanen konstanten Komponenten aufweisen. Ein völlig anderer Ansatz zur Herstellung monoklonaler Antikörper besteht darin, daß die Antigen-Bindungsdomänen (z.B. menschlicher) Antikörper in einer  
25 hochkomplexen Bakteriophagen-Bibliothek gentechnisch exprimiert werden, aus welcher geeignete Bindungsdomänen durch ihre Affinität für CD28 isoliert und zu vollständigen Antikörpern ergänzt werden können.

30 Hinsichtlich der pharmazeutischen Zusammensetzung können die Wirkstoffkomponenten b) bis e) entsprechend der HAART Therapie ausgewählt, dosiert und darreichungsfertig hergerichtet sind. Grundsätzlich sind alle bestehenden und zukünftig entwickelten Varianten der HAART Therapie oder einer anderen  
35 Therapie brauchbar, solange nicht durch eine oder mehrere

Wirkstoffkomponenten die aktivierende Wirkung der monoklonalen Antikörper (über-) kompensiert wird. Im Rahmen derzeitiger Therapieansätze ist oft erfolgversprechend, wenn die Wirkstoffkomponente b) ein Pyrimidin-Nukleosidanalogs, vorzugsweise 3'-Azido-3'-desoxythymidin, ist und/oder die Wirkstoffkomponente c) 3TC ist, und/oder die Wirkstoffkomponente d) zwingend eingerichtet ist. In Hinblick auf eine Variante eines erfindungsgemäßen Behandlungsplans kann es zweckmäßig sein, wenn die Wirkstoffkomponenten b) bis e) Bestandteil einer ersten Paketkomponente und die Wirkstoffkomponente a) Bestandteil einer zweiten Paketkomponente sind.

Bei der Anwendung der Erfindung in einem Behandlungsverfahren können die Wirkstoffkomponenten b) bis e) entsprechend der HAART Therapie ausgewählt, dosiert und dargereicht werden, wobei die Wirkstoffkomponente a) vor, zusammen oder nach den Wirkstoffkomponenten b) bis e) dargereicht werden. Im einzelnen können die Wirkstoffkomponenten b) bis e) kontinuierlich und die Wirkstoffkomponente a) einmal oder mehrmals in zeitlichen Abständen mit Ruhepausen, dargereicht werden. Die Wirkstoffkomponente b) kann ein Pyrimidin-Nukleosidanalogs, vorzugsweise 3'-Azido-3'-desoxythymidin, und/oder die Wirkstoffkomponente c) kann 3TC, und/oder die Wirkstoffkomponente d) kann zwingend eingerichtet sein.

Im Rahmen eines erfindungsgemäßen Behandlungsplans kann die Darreichung der Wirkstoffkomponente b) im Rahmen eines Behandlungsunterplans erfolgen, welcher die HAART Therapie ist. Zunächst erfolgt die HAART Grundtherapie über eine Dauer von 1 bis 12 Monate, vorzugsweise 2 bis 6 Monate, höchstvorzugsweise 2 bis 4 Monate, beispielsweise 3 Monate (1 Monat = 30 Tage). Während dieser Zeit können CD4 T-Zellzahlen und/oder Virusbelastung und/oder Latenzvirus (beispielsweise gemäß der Literaturstelle T.W. Chun et al., Nature, 387:183-188

(1997)) regelmäßig überprüft werden und kann auf Basis dieser Ergebnisse die HAART Therapie individuell auf den Patienten angepaßt werden (durch Wahl bzw. Austausch und Kombination der Reverse Transkriptase Inhibitoren und/oder der Protease Inhibitoren sowie der jeweiligen Dosierungen). In einem ersten Zyklus kann dann eine vorzugsweise i.v. Injektion von Antikörpern in einer Dosierung von 0,1 bis 50, vorzugsweise 0,5 bis 20, höchstvorzugsweise 0,5 bis 5 mg/kg Körpergewicht erfolgen unter Aufrechterhaltung der HAART Therapie. Die vorstehende Dosis kann auf einmal oder in 2 bis 10, vorzugsweise 2 bis 5, Teilmengen über einen Zeitraum von 1h bis 1 Monat, vorzugsweise 1 Tag bis 5 Tage, gleichmäßig oder ungleichmäßig verteilt verabreicht werden. In einer hieran anschließenden Ruhepause (unter Aufrechterhaltung von HAART) von 1 Tag bis 6 Monaten, vorzugsweise 0,5 bis 2 Monaten, beispielsweise 1 Monat, kann eine Überwachung der vorstehend zur Grundtherapie genannten Werte und/oder des Blutbildes und/oder der Blutwerte und/oder klinisch internistischer Befunde und/oder der Bildung von anti-Immunglobulin Antikörpern (anti-Tier Ig bei nicht humanisierten Antikörpern, anti-idiotypisch nach Humanisierung) erfolgen. Nach Ablauf der Ruhepause kann bei Bedarf der Zyklus beginnend mit der Darreichung des Antikörpers wiederholt werden. Wenn PBMC (Lymphozyten plus Monozyten) virus- und latenzvirus- bzw. provirusfrei sind, kann bei Einverständnis des Patienten eine Lymphknotenbiopsie zur Verifizierung durchgeführt werden. Bei positivem Ergebnis (positiv = Detektion von Virus bzw. Latenzvirus bzw. Provirus) können weitere Zyklen der vorstehend beschriebenen Art angeschlossen werden. Bei negativem Ergebnis kann die Darreichung von HAART Wirkstoffen und von Antikörpern abgesetzt werden. Es empfiehlt sich, nach Absetzung weiter Kontrolluntersuchungen der vorstehenden Art in bestimmten zeitlichen Abständen durchzuführen, um ggf. die Behandlung wieder aufzunehmen. Die vorstehenden Ausführungen gelten entsprechend für ein Behandlungsverfahren.

Eingesetzt werden können im Rahmen der Erfindung beispielsweise der monoklonale Antikörper CMY-2, erhältlich aus Hybridomzellen gemäß Hinterlegung DSM ACC2353, oder der  
5 käuflich von der Firma ALEXIS Deutschland GmbH, D-35305 Grünberg, erhältliche und von der Firma Ansell Corporation, USA, hergestellte Klon ANC28.1/5D10 oder eine vorzugsweise humanisierte bzw. humanverträgliche Variante des Klons ANC28.1/5D10.

10

Erfindungsgemäß eingesetzte monoklonale Antikörper können insbesondere Spezifität für Determinanten des menschlichen CD28-Moleküls aufweisen, die auf dem natürlicherweise exprimierten CD28-Molekül schwer zugänglich sind und deren Be-  
15 setzung durch die monoklonale Antikörper zur Aktivierung der T-Zellen führt.

Die galenische Herrichtung von Wirkstoffkomponenten oder von Mischungen daraus für die verschiedenen Verabreichungsformen  
20 ist dem Fachmann gut bekannt und braucht hier nicht näher erläutert zu werden.

Zu einer Anspruchskategorie getroffene Erläuterungen gelten für die Gegenstände der anderen Anspruchskategorien  
25 entsprechend.

Im Rahmen der Erfindung können optional noch zusätzliche Wirkstoffe präsent sein oder verwendet werden, welche von den vorstehend genannten und gemäß der Grundkonzeption der Er-  
30 findung eingesetzten Wirkstoffen verschieden sind. Solche zusätzliche Wirkstoffe sind beispielsweise Wirkstoffe, welche eventuellen Nebenwirkungen entgegenwirken. Lediglich beispielhaft seien anti-TNF-Antikörper (TNF = Tumor Nekrose Faktor) im Falle einer proinflammatorischen TNF Reaktion  
35 genannt. Zusätzliche Wirkstoffe sind weiterhin Wirkstoffe,

welche im Zusammenhang mit der Expansion des Immunsystems hilfreich sein können. So kann beispielsweise durch Gabe von IL-2 die Proliferation von CD8-Zellen induziert bzw. verstärkt werden. Generell können als zusätzliche Wirkstoffe immunmodulierende Wirkstoffe eingesetzt werden nach Maßgabe des immunologischen (Detail- bzw. Neben-) Prozesses welcher im Zusammenhang mit der Erfindung zweckmäßigerweise gefördert (oder gehemmt) wird. Beispiel hierfür sind Oligonukleotide enthaltend CpG Motive (D. Klinman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:2879-2883 (1996)).

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert. U.a. wird die Herstellung erfindungsgemäß eingesetzter monoklonaler Antikörper beschrieben. In diesen Ausführungsbeispielen werden auch Screeningverfahren im einzelnen deutlich, mit welchen erfindungsgemäße monoklonale Antikörper bzw. zugrundeliegende Hybridomzellen selektiert werden können. Aus den folgenden Beispielen werden auch die therapeutischen Wirkungen deutlich.

Beispiel 1: Herstellung und Wirkung eines ersten erfindungs-  
gemäß verwendbaren monoklonalen Antikörpers.

25 1.1 Allgemeine Informationen.

Die dargestellten Experimente bzw. die Beispiele zu den Wirkungen von "direkten" CD28-spezifischen monoklonalen Antikörpern wurden im Tiermodell der Ratte durchgeführt, wobei als Beispiel für einen "klassischen" CD28-spezifischen Antikörper der monoklonale Antikörper JJ319 und als Beispiel für einen "direkt" aktivierenden der monoklonale Antikörper JJ316 eingesetzt wird. Beide Antikörper sind frei verfügbar und käuflich erwerbbar von der Firma Pharmingen, San Diego, USA. JJ319 und JJ316 Antikörper sind im übrigen erhältlich

gemäß der Literaturstelle M. Tacke et al., Immunology, 1995, 154: 5121-5127, auf welche hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird, auch im Hinblick auf Details der Herstellung von Hybridomzellen und monoklonalen Antikörpern.

5

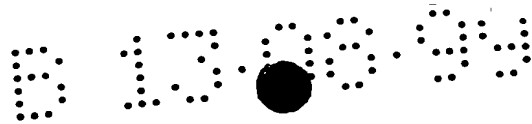
## 1.2: Herstellung monoklonaler Antikörper

In diesem Beispiel wird die Herstellung erfindungsgemäßer, d.h. human-CD28-spezifischer monoklonaler Antikörper näher erläutert. Diese werden folgend auch als CMY-2 bezeichnet. Human CD28 aus einer cDNA Bibliothek wurde in A20J und/oder L929 Zelllinien rekombinant exprimiert. Zunächst wurde hierzu ein Plasmid mittels Insertion von Human-CD28 cDNA in den pH8APr-1-neo Vector nach Excision des SalI-HindIII Fragments geschaffen. Aus Escherichia coli (MC1061) wurden Protoplasten hergestellt, welche das Plasmid tragen. Dann erfolgte eine Fusionierung der Protoplasten mit Maus A20J und/oder L929 Tumorzellen mittels Polyethylenglykol. Die so erhaltenen transfektierten Zellen wurden auf übliche Weise kultiviert. Anschließend erfolgte ein Screenen der transfektierten Maus A20J und/oder L929 Zellen auf die Expression von Human-CD28 und Selektion von Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen.

25

Der Nachweis der erfolgreichen Expression erfolgte mit Hilfe eines konventionellen, kommerziell erhältlichen fluoreszenzmarkierten Antikörpers mit Spezifität für Human CD28 (9.3-Phykoerythrin). Als Negativkontrolle wurden nicht trans- fizierte A20J- bzw. L929-Zellen mit dem gleichen Antikörper gefärbt. Die Transfektanten (A20J-CD28 und L929-CD28) zeigten eine höhere Fluoreszenzintensität. Da nicht alle Zellen CD28 positiv waren, wurden CD28-positive Zellen subkloniert und zur Immunisierung verwendet. Wie in Fig. 1 an der Verschiebung der Punktwolken nach oben in den beiden rechten

35



Diagrammen erkennbar, reagierten diese Zellen mit dem käuflichen Antikörper, drückten also Human CD28 an ihrer Oberfläche aus.

- 5 Die A20J Human-CD28 Zelllinie wurde zur Immunisierung von BALB/c Mäusen verwendet. Zellfusion und screening wurden wie folgt durchgeführt: i) Immunisierung von BALB/c Mäusen mit den Human-CD28 exprimierenden Maus A20J Zellen (Injektionen 6 x i.p. und anschließend 1 x i.v.). ii) Entnahme von  
10 Milzzellen der so immunisierten Mäuse und Fusionierung der Milzzellen mit Zellen der Zelllinie X63-Ag 8.653 mittels Polyethylenglykol. iii) Selektierung der so erhaltenen Hybridomzellen mit der Maßgabe, daß im Überstand selektierter Hybridomzellen Antikörper enthalten sind, die an Human-CD28  
15 exprimierende Maus A20J und/oder L929 Zellen binden.

Als read-out diente die Anfärbung einer Mischung aus CD28 transfizierten und untransfizierten Maus L929 Tumorzellen. Fig. 2 zeigt, daß der auf diesem Weg isolierte monoklonale  
20 Antikörper CMY-2 transfizierte und untransfizierte Zellen durch unterschiedliche Fluoreszenzintensität unter- scheidet. Das differentielle Screening auf Antikörper gegen Human-CD28 erfolgte wie folgt. Je 50 Öl Überstand von kultivierten Zellhybridomen wurden entnommen und mit einem  
25 Gemisch aus L929-Zellen und L929-CD28-Transfektanten 15 min inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit DaMIg-PE angefärbt. Teil A zeigt die Negativkontrolle. Die Zellen wurden nur mit DaMIg-PE inkubiert. Teil B zeigt die Färbung mit einem Überstand, der leicht positiv war, aber keinen  
30 Unterschied bei beiden Zellen zeigt. Teil C zeigt die mit einem Überstand von CMY-2 gefärbten Zellen.

In nicht dargestellten Experimenten wurden periphere Blutzellen des Menschen mit dem neu isolierten CMY-2 und dem  
35 "klassischen" CD28-spezifischen Antikörper 9.3 gefärbt. Es



Zusammengefaßt zeigen die Experimente, daß CMY-2 ein human  
5 CD28-spezifischer Antikörper ist.

15 Kostimulation:

20 Direkte Stimulation:

25 Zur Erläuterung: Anti-CD3 sorgt für T-Zellrezeptor-  
Stimulation (CD3 ist Teil des TCR-Komplexes). CMY-2 wurde in  
Form eines nicht aufgereinigten Kulturüberstandes (50%  
Endvolumen) verwendet. Erfahrungsgemäß ist die dabei zu  
erwartende effektive mAk-Konzentration suboptimal für eine  
30 direkte Aktivierung, aber ausreichend für die Kostimulation.  
Das Experiment zeigt, daß CMY-2 direkt aktivierende  
Eigenschaften hat.

Hybridomzellen, welche CMY-2 produzieren, sind bei der DSMZ,  
35 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,



Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, unter der Nummer DSM ACC2353 (20.05.1998) hinterlegt worden.

### 1.3 Proliferative Antwort auf den Antikörper aus 1.2.

5

Fig. 3 zeigt die proliferative Antwort ungetrennter Lymphknotenzellen der Ratte auf den "direkt" stimulierenden CD28-spezifischen monoklonalen Antikörper (JJ316) und das Ausbleiben einer solchen Antwort bei Einsatz eines

10 "klassischen " CD28-spezifischen monoklonalen Antikörpers (JJ319). Die Zellen wurden zwei Tage lang in 0,2 ml Medium (RPMI 1640, erhältlich von GIBCO/BRL, enthaltend 5 % FCS [fetal calf serum]) in An- oder Abwesenheit der angegebenen Zusätze bei einer Dichte von 1 Mio. Zellen pro ml im begasten  
15 Brutschrank kultiviert. Die Zellteilungsaktivität wurde durch den Einbau radioaktiv markierten Thymidins (1  $\mu$ Ci/Ansatz für 16 Std., 1Ci = 37GBq, Bestimmung mit  $\beta$ -Detektor) bestimmt.

Im Gegensatz zu veröffentlichten Resultaten (Siefken et al.,  
20 Cellular Immunology, 1997, 176: 59-65) zeigt dieses Ergebnis, daß es für die T-Zell-Aktivierung durch direkt aktivierende CD28-spezifische monoklonale Antikörper nicht notwendig ist, diese artifiziell durch einen zweiten Antikörper miteinander zu vernetzen. Vielmehr reicht die Anwesenheit von nicht-T-  
25 Zellen aus lymphoiden Organen, nämlich von B-Lymphozyten und sogenannten akzessorischen Zellen, um eine direkte Aktivierung durch löslich zugegebene CD28-spezifische monoklonale Antikörper zu ermöglichen. Wahrscheinlich geschieht dies durch Bindung der monoklonale Antikörper an sogenannte  
30 Fc-Rezeptoren dieser nicht-T-Zellen. Dieses Ergebnis ist eine wichtige Voraussetzung für den therapeutischen Einsatz "direkt" stimulierender CD28-spezifischer monoklonale Antikörper, in dem eine artifizielle Vernetzung mit anti-Immun-

globulin Antikörpern im Gesamtorganismus nicht praktikabel ist.

"Direkt" aktivierende CD28-spezifische monoklonale Antikörper führen zu einer Erhöhung der CD4 T-Zellzahl im intakten Organismus. Fig. 4 zeigt dies für Lymphknoten der Ratte, die am Tag 0 1 mg des "direkt" stimulierenden CD28-spezifischen monoklonale Antikörpers (JJ316) oder des "klassischen" CD28-spezifischen monoklonalen Antikörpers (JJ319) erhalten hatten. Mit erfindungsgemäßen direkt aktivierenden monoklonalen Antikörpern mit Spezifität für Human-CD28, und deren Fähigkeit, die Vermehrung von T-Lymphozyten zu stimulieren, werden ganz analoge Effekte erreicht. Im vorliegenden Beispiel ist die CD4 T-Zellzahl nur vorübergehend erhöht; das liegt daran, daß gesunde Tiere mit normalen CD4 T-Zellzahlen behandelt wurden. Die aufgrund der Proliferationsstimulierung "überschüssigen" Zellen werden durch homöostatische Mechanismen abgebaut.

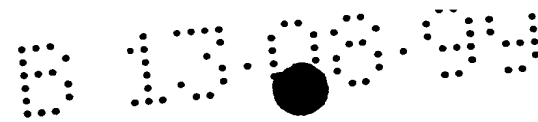
Die vorstehend im einzelnen erläuterten Ergebnisse zeigen, daß eine Aktivierung der T-Lymphozyten erfolgt, und zwar ohne die Notwendigkeit weiterer Wirkstoffe.

Beispiel 2: Verwendung erfindungsgemäß eingesetzter Antikörper in Verbindung mit der HAART Therapie

## 2.1: Allgemeine Informationen.

30

In den folgend beschriebenen Versuchen wurde anstelle des in Beispiel 1 beschriebenen monoklonalen Antikörpers der Antikörper Klon ANC28.1/5D10 der Firma Ancell Corporation, USA, vertrieben von der Firma ALEXIS Deutschland GmbH, Giessener Str. 12, D-35305 Grünberg, eingesetzt. Von diesen Antikörpern



ist bekannt, daß sie in CD28 positiven Zellen IL-2 induzieren. Eine proliferationsinduzierende Aktivität dieses Antikörpers ist jedoch bislang nicht beschrieben worden. Dieser Antikörper wird folgend kurz als "aCD28" bezeichnet. In den 5 folgenden Versuchen wird zu Vergleichszwecken ein monoklonaler Antikörper verwendet, welcher nicht "direkt" stimulierend ist, nämlich CD28.2.

Die Versuche wurde, sofern nicht anders angegeben, in humanen 10 PBL oder in PBL von Rhesusaffen durchgeführt. Dieser Zellkulturansatz kommt der Situation im Gesamtorganismus nahe, weil der stimulierende Antikörper, wie für eine Therapie vorgesehen, in löslicher Form zugesetzt wird.

15 Bei allen Proliferationsexperimenten wurde gemessen durch einen Puls von 1µCi <sup>3</sup>H-Tymidin für 16 Stunden zwischen Tag 3 und Tag 4 und Detektion mittels β-Detektor.

Sofern nicht anders angegeben wurden Zellen in 0,2 ml Medium 20 (RPMI 1640, erhältlich von GIBCO/BRL, enthaltend 5% menschliches AB Serum) bei einer Dichte von 1 Mio. Zellen pro ml im begasten Brutschrank kultiviert.

2.2: Induktion von T-Zellproliferation in peripheren Blut- 25 Lymphozyten und/oder Monozyten (PBMC) durch aCD28.

In der Fig. 5 sind Versuche zum Maß der Aktivierung der Proliferation von CD4 T-Zellen dargestellt. Der Nachweis erfolgte durch Immunfluoreszenz und Durchflußzytometrie 30 (FACS) am Tage vier nach Stimulation der Zellen in vitro. Fig. 10a zeigt sogenannte "dotplots", wobei durch ein Gate (R2) die CD4 T-Zellen definiert werden (sie exprimieren CD3 und CD4). In der Fig. 10b ist in einem Histogramm die Anfärbung dieser CD4 T-Zellen mit einem monoklonalen Antikörper 35 gegen den Transferinrezeptor (CD71) dargestellt. Die

Expression dieses Oberflächenrezeptors charakterisiert proliferierende Zellen. Man erkennt, daß in einem Großteil, nämlich >90%, der CD4+ T-Lymphozyten die Proliferation durch aCD28 (direkt) induziert wird. Die Untersuchungen erfolgten mit 5 µg/ml aCD28.

In der Fig. 6 sind entsprechende Darstellungen, jedoch ohne Stimulation, als Negativkontrollen gezeigt.

10

2.3: Vergleich der Stimulation der Proliferation von ungetrennten PBMC durch aCD28 und IL-2.

Die Figur 7 zeigt, daß die Proliferation ungetrennter PBMC von nicht infizierten menschlichen Spendern, gemessen am Einbau <sup>3</sup>H-markierten Tymidins, durch aCD28 stärker ist als durch IL-2. Dies zeigt, daß mehr Zellen mittels aCD28 angesprochen werden als bei der in vivo Therapie mit HAART und IL-2 gemäß dem Stand der Technik. Die Kultivierung erfolgte in Gegenwart von 5 µg/ml aCD28 bzw. 20 I.U./ml IL-2 in 96-well Rundboden Platten.

Wichtig ist darüber hinaus, daß IL-2 präferentiell CD8T-Lymphozyten zur Proliferation stimuliert, während durch aCD28 besonders CD4 T-Zellen angesprochen werden. Dies ist aus den Daten der Tabelle I ersichtlich: PBMC eines HIV infizierten Patienten wurden drei oder 10 Tage mit IL-2 bzw. aCD28 stimuliert. Durch IL-2, nicht aber durch aCD28 erfolgte eine deutliche Verschiebung zu Gunsten der CD8 T-Zellen.

30

Tabelle I

	nach 3 Tagen		nach 10 Tagen	
	CD4	CD8	CD4	CD8

35

Medium	51	49	50	50
IL-2	46	54	27	73
aCD28	57	43	62	38

5

2.4: Stimulation der Proliferation von PBMC aus Virus-infizierten Organismen.

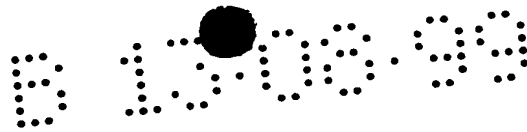
Figur 8A zeigt die aktivierende Wirkung von aCD28 auf die Proliferation von PBMC aus HIV-1 infizierten Personen, Figur 8B Entsprechendes für PBMC aus SIV-infizierten Rhesusaffen. Eingesetzt wurde eine Menge von 5µg/ml aCD28. In allen Fällen konnte starke Proliferation induziert werden, die bei massiver HIV-Infektion jedoch am geringsten ausfiel. Dies hängt vermutlich mit der damit einhergehenden massiven Induktion der Virusvermehrung und damit einhergehender T-Zellzerstörung zusammen, die bei erfindungsgemäßer Behandlung bei gemeinsamer Darreichung von HAART Wirkstoffen vermieden wird (siehe auch Beispiel 2.6a und Fig. 10).

20

2.5: Aktivierung der Proliferation in Gegenwart von HAART-Wirkstoffen.

PBLs einer HIV-1 infizierten Person wurden nicht, mit HAART Wirkstoffen (Zidovudine + Didanosine + Saquinavir; 0,1µM) allein, mit aCD28 (5µg/ml) allein oder mit beidem behandelt. Nach 6 Tagen wurde die Proliferation gemessen.

Mann erkennt in der Figur 9, in welcher die Ergebnisse dargestellt sind, daß die Induktion der Proliferation mittels aCD28 durch Anwesenheit von HAART nicht berührt ist.



2.5a Förderung der CD28-, nicht jedoch der IL-2-induzierten T-Zellproliferation.

PBMC eines HIV-1 infizierten Patienten wurden wie vorstehend  
5 beschrieben stimuliert. Die Proliferation wurde von Tag 3 zu  
Tag 4 gemessen. Wie bei infizierten Patienten bisweilen beobachtet,  
induziert IL-2 eine stärkere Proliferation als CD28,  
die jedoch vorwiegend die nicht HIV belasteten CD8 T-Zellen  
betrifft (siehe Tabelle I). Diese wird nicht durch HAART beeinflusst,  
10 während die aCD28-induzierte durch HAART verbessert wird.  
(siehe Fig. 10)

2.6: Einfluß von aCD28/HAART auf die Virusreplikation.

15

Untersucht wurde die Virusreplikation in PBMC von HIV-1 infizierten  
Personen. In Wochenabständen wurde freier Überstand mittels ELISA auf  
die Gegenwart von p24Gag (Virusprotein) untersucht. HAART wurde wie in  
Beispiel 2.5 verwendet. "+"

20 bedeutet hier und folgend Einsatz der betreffenden Wirkstoffkomponente,  
"-" Abwesenheit. Man erkennt in der Fig. 11, daß die aCD28 Stimulation  
auch eine massive Virusproduktion induziert. Bei gleichzeitiger HAART  
ist die Virusproduktion jedoch vollständig unterdrückt. PHA ist

25 Phytohämagglutinin zum Vergleich.

2.7: Verlust der HIV-1 Produktion nach Behandlung mit aCD28 und HAART.

30

In der Figur 12 sind Ergebnisse einer Versuchsreihe dargestellt,  
wobei PBMC von einer HIV-1 infizierten Person bis zum Tag 6 gemäß  
der Tabelle behandelt wurden. Vom Tag 6 bis zum Tag 9 erfolgte eine  
reine HAART Behandlung, gefolgt von einer Behandlung mit aCD28  
(auch ComMCD28 genannt) vom

Tag 9 bis zum Tag 14. Die Ergebnisse bestätigen jene aus Beispiel 2.7, da demgemäß auch nach erneuter Stimulation von Zellkulturen HIV-infizierter PBMC nach Beendigung der HAART Therapie keine Virusproduktion beobachtet wird.

5

2.8: Verlust auch proviraler HIV DNA nach Behandlung mit aCD28 und HAART.

10 PBMC welche von einer HIV-1 infizierten Person isoliert wurden, wurden entsprechend der Tabelle kultiviert und in vitro behandelt (Wirkstoffe und Wirkstoffmengen wie in Beispiel 2.5). Am 11. Tag der Kultivierung wurde eine HIV-1 spezifische DNA-PCR durchgeführt:

15

a) extern; primer:

JA4(gag1319-1338): gaa ggc ttt cag ccc aga ag

JA7(gag1615-1596): tct cct act ggg ata ggt gg

Annealing Temp.: 47°C; 42 Zyklen

20

b) nested; primer:

JA5(gag1446-1465): acc atc aat gag gaa gct gc

JA6(gag1577-1558): tat ttg ttc ctg aag ggt ac

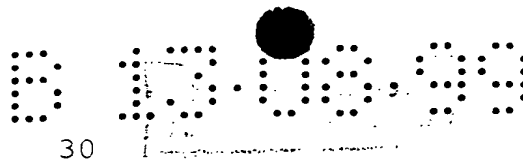
Annealing Temp.: 45°C; 25 Zyklen.

25

In der Figur 13 hierzu erkennt man, daß provirale HIV DNA bei kombinierter Behandlung mit HAART und erfindungsgemäß eingesetzten monoklonalen Antikörpern nicht mehr nachweisbar ist, während in den anderen Fällen der Tabelle stets provirale HIV DNA präsent war. Dies demonstriert in einem der Situation des Gesamtorganismus sehr nahe kommenden Testsystem die erfolgreiche Zerstörung auch des Reservoirs an proviralen Strukturen durch die Erfindung.

35





## Patentansprüche:

1. Verwendung monoklonaler Antikörper, welche für CD28 spezifisch sind und T-Lymphozyten mehrerer bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines Antigenrezeptors der T-Lymphozyten und somit antigenunspezifisch aktivieren, oder eines Analogen hierzu zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung in der Ausführungsform als Präparat oder Präparatepaket zur Behandlung von Virusinfektionen beim Menschen oder niedrigeren Warmblütern, bei welchen T-Lymphozyten infiziert sind, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung zusätzlich einen Virus Inhibitor enthält.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei CD4 T-Lymphozyten, insbesondere Human-CD4 T-Lymphozyten infiziert sind, wobei die monoklonalen Antikörper für Human-CD28 spezifisch sind und wobei die monoklonalen Antikörper optional humanverträglich sind.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Virusinfektion eine Infektion mit Retrovirus, insbesondere Lentivirus, beispielsweise HIV, ist.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Virus Inhibitor ein Reverse Transkriptase Inhibitor, vorzugsweise ein Pyrimidin-Nukleosidanalogue, höchstvorzugsweise 3'-Azido-3'-desoxythymidin (AZT oder Zidovudine), ist und optional weiterhin zusätzlich andere hiervon verschiedene Nukleosidanalogue, vorzugsweise 3TC, in der pharmazeutischen Zusammensetzung enthalten sind.

5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung zusätzlich einen Proteaseinhibitor enthält und optional weiterhin zusätzlich andere, hiervon verschiedene Proteaseinhibitoren.

6. Pharmazeutische Zusammensetzung in einer Ausführungsform als Präparat oder als Präparatepaket, mit pharmazeutisch wirksamen Dosen der folgenden Wirkstoffkomponenten:

a) vorzugsweise humanverträglichen monoklonalen Antikörpern, welche für CD28, vorzugsweise Human-CD28 spezifisch sind und T-Lymphozyten, vorzugsweise Human-T-Lymphozyten mehrerer bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines Antigenrezeptors der T-Lymphozyten und somit antigenunspezifisch aktivieren, oder einem Analog hierzu

b) einem Virus Inhibitor, vorzugsweise einem Reverse Transkriptase Inhibitor,

c) optional einem von b) verschiedenen Reverse Transkriptase Inhibitor,

d) optional einem Protease Inhibitor,

e) optional einem von d) verschiedenen Protease Inhibitor.

7. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 6, wobei die Wirkstoffkomponenten b) bis e) entsprechend der HAART Therapie ausgewählt, dosiert und darreichungsfertig hergerichtet sind.

8. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 6' oder 7,  
wobei

5

die Wirkstoffkomponente b) ein Pyrimidin-Nukleosidanalogue,  
vorzugsweise 3'-Azido-3'-desoxythymidin, ist und/oder

die Wirkstoffkomponente c) 3TC ist, und/oder

10

die Wirkstoffkomponente d) zwingend eingerichtet ist.

9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 6  
bis 8, wobei die Wirkstoffkomponenten b) bis e) Bestand-  
teil einer ersten Paketkomponente und die Wirkstoffkompo-  
nente a) Bestandteil einer zweiten Paketkomponente sind.

15

10. Paketkomponente eines Präparatepakets nach einem der An-  
sprüche 6 bis 9 enthaltend die Wirkstoffkomponente a).

20

11. Verfahren zur Behandlung von Virusinfektionen mit  
Retrovirus, insbesondere Lentivirus, beispielsweise HIV,  
wobei eine pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der  
Ansprüche 6 bis 9 einem von der Virusinfektion befallenen  
menschlichen Körper oder einem Körper eines niedrigeren  
Warmblüters dargereicht wird.

25

30

12. Verfahren zur Behandlung von Virusinfektionen mit  
Retrovirus, insbesondere Lentivirus, beispielsweise HIV,  
wobei einem menschlichen Körper oder einem Körper eines

35

niedrigeren Warmblüters folgende Wirkstoffkomponenten in pharmazeutisch wirksamer Dosis dargereicht werden:

- 5 a) vorzugsweise humanverträgliche monoklonale Antikörper, welche für CD28, vorzugsweise Human-CD28, spezifisch sind und T-Lymphozyten, vorzugsweise Human-T-Lymphozyten mehrerer bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines Antigenrezeptors der T-Lymphozyten und somit antigenunspezifisch aktivieren, oder ein Analog  
10 hierzu,
  - b) ein Virus Inhibitor, vorzugsweise ein Reverse Transkriptase Inhibitor,
  - 15 c) optional ein von b) verschiedener Reverse Transkriptase Inhibitor,
  - d) optional ein Protease Inhibitor,
  - 20 e) optional ein von d) verschiedener Protease Inhibitor.
- 
- 25 13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Wirkstoffkomponenten b) bis e) entsprechend der HAART Therapie ausgewählt, dosiert und dargereicht werden und wobei die Wirkstoffkomponente a) vor, zusammen oder nach den Wirkstoffkomponenten b) bis e) dargereicht werden.
  - 30 14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, wobei die Wirkstoffkomponenten b) bis e) kontinuierlich und die Wirkstoffkomponente a) einmal oder mehrmals in zeitlichen Abständen mit Ruhepausen, dargereicht werden.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14, wobei

die Wirkstoffkomponente b) ein Pyrimidin-Nukleosidanalogue,  
vorzugsweise 3'-Azido-3'-desoxythymidin, ist und/oder

5

die Wirkstoffkomponente c) 3TC ist, und/oder

die Wirkstoffkomponente d) zwingend eingerichtet ist.

10

16. Verwendung eines vorzugsweise humanverträglichen monoklonalen Antikörpers a), welcher für CD28, vorzugsweise Human-CD28, spezifisch ist und T-Lymphozyten, vorzugsweise Human-T-Lymphozyten mehrerer bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines Antigenrezeptors der T-Lymphozyten und somit antigenunspezifisch aktiviert, oder eines Analogen hierzu und eines Virus Inhibitors b), vorzugsweise eines Reverse Transkriptase Inhibitors, in Form einer Mischung oder von räumlich getrennten Zusammensetzungen, von denen die eine die Wirkstoffkomponente a) und die andere die Wirkstoffkomponente b) enthält, als Mittel zur kontinuierlichen und/oder unterbrochenen Anwendung bei der Behandlung von Virusinfektionen mit Retrovirus, insbesondere Lentiviren, beispielsweise von AIDS, bei Menschen oder niedrigeren Warmblütern nach einem Behandlungsplan, der einen oder mehrere Zyklen umfaßt, wobei der Behandlungsplan aus folgenden Stufen besteht:

15

20

25

30

i) zunächst wird die Wirkstoffkomponente b) in einer pharmazeutisch wirksamen Dosis kontinuierlich dargereicht,

ii) nach einer vorgegebenen Dauer der Stufe i) wird die Wirkstoffkomponente a) in einer pharmazeutisch

35

wirksamen Dosis dargereicht bei fortfahrender Darreichung der Wirkstoffkomponente b)

5       iii) optional wird Stufe ii) nach einer vorgegebenen Ruhepause bei fortfahrender Darreichung der Wirkstoffkomponente b) einmal oder mehrmals wiederholt.

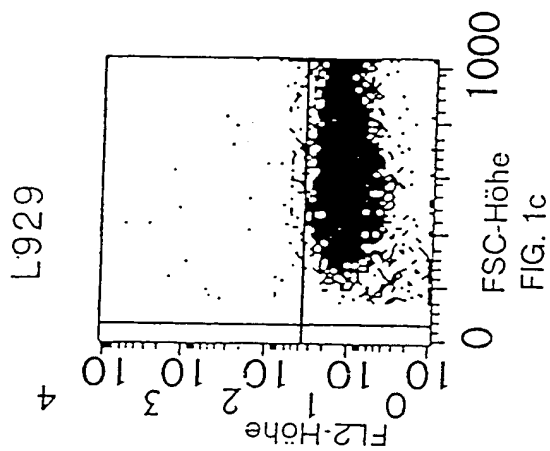
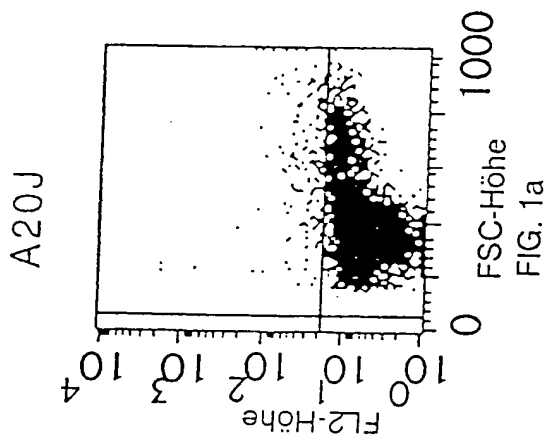
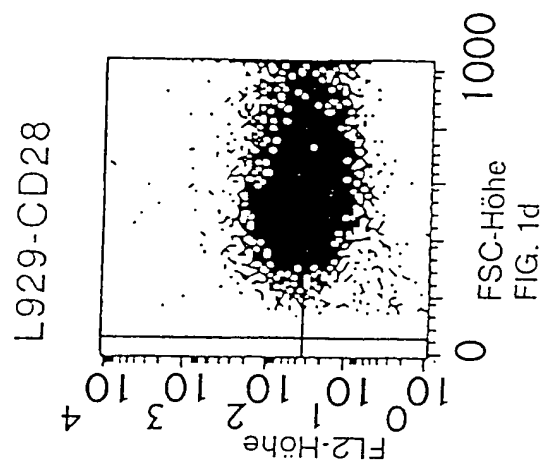
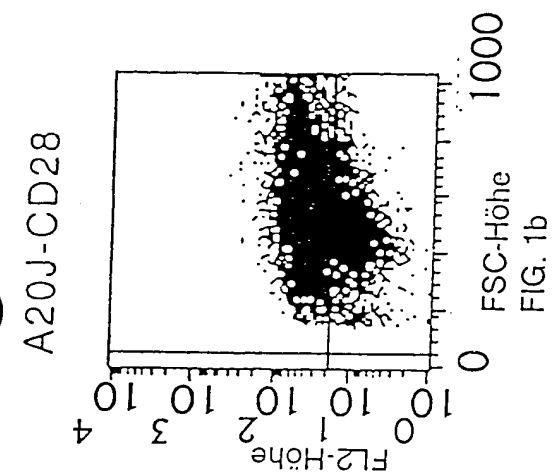
10 17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei die Darreichung der Wirkstoffkomponente b) im Rahmen eines Behandlungsunterplans erfolgt, welcher die HAART Therapie ist.

15 18. Verwendung, pharmazeutische Zusammensetzung, Paketkomponente oder Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, wobei der monoklonale Antikörper CMY-2, erhältlich aus Hybridomzellen gemäß Hinterlegung DSM ACC2353, oder Klon ANC28.1/5D10 oder eine vorzugsweise humanisierte bzw.  
20 humanverträgliche Variante des Klons ANC28.1/5D10 ist.

25

30

35



ANTI-CD28-PE

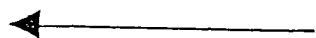


FIG. 2A

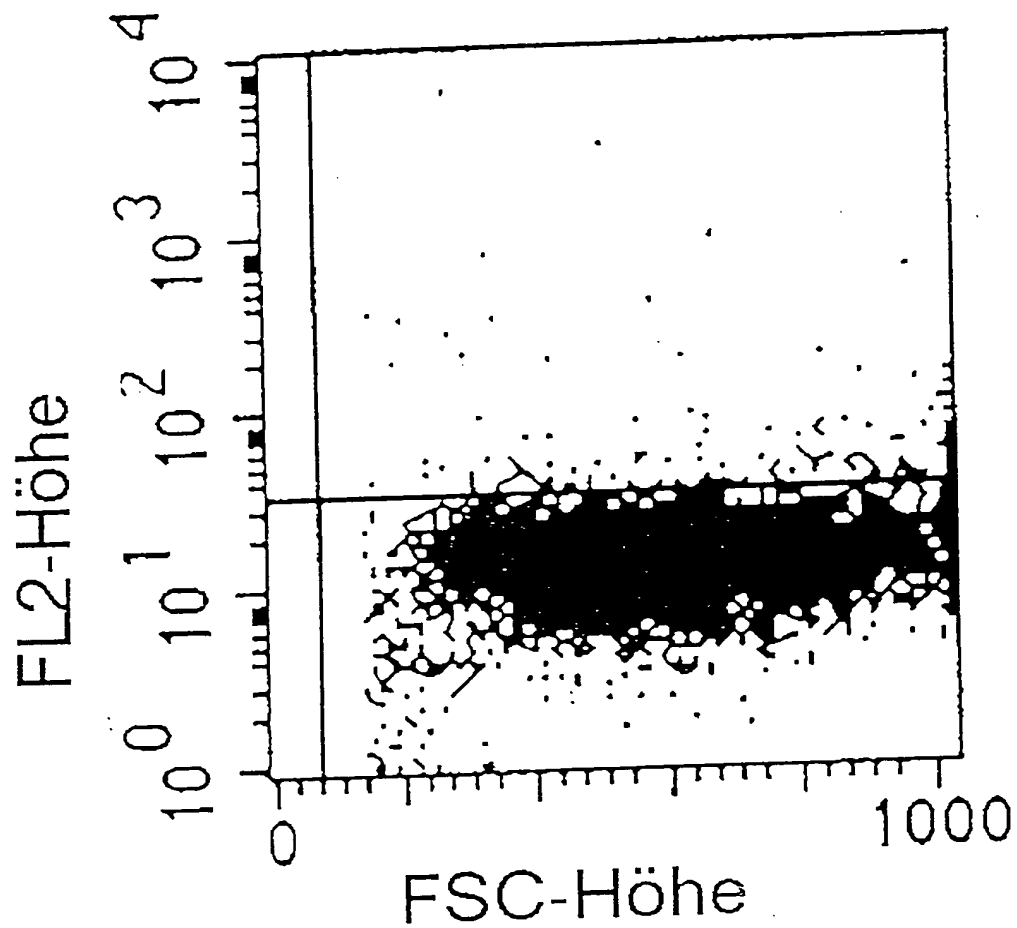




FIG. 2B

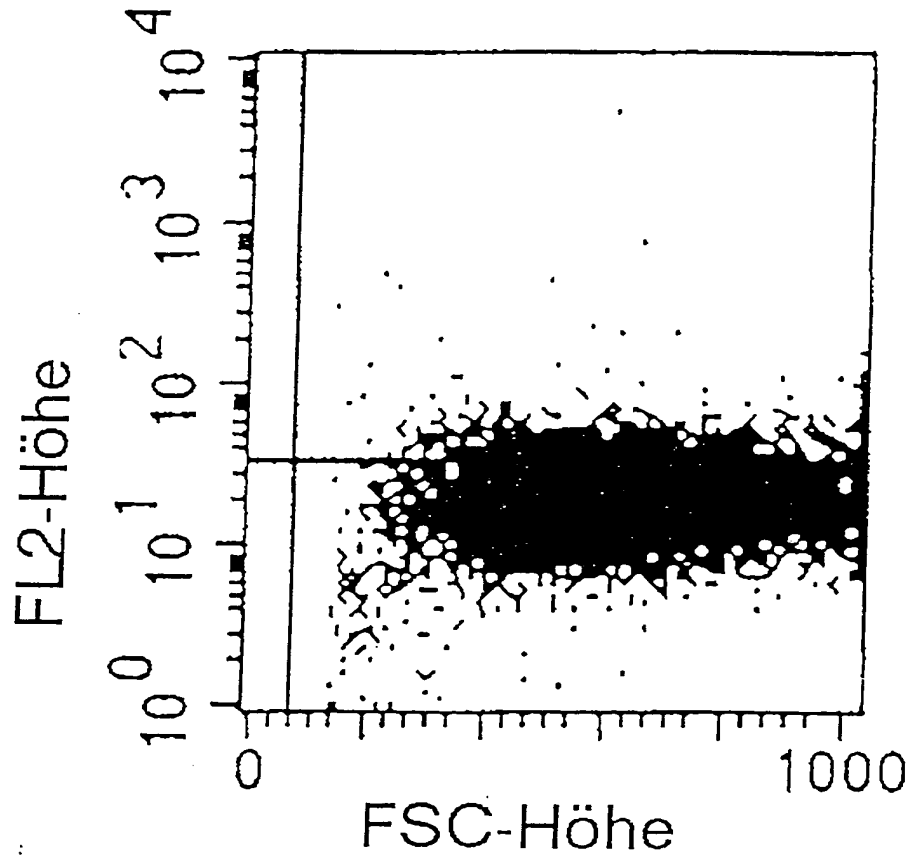
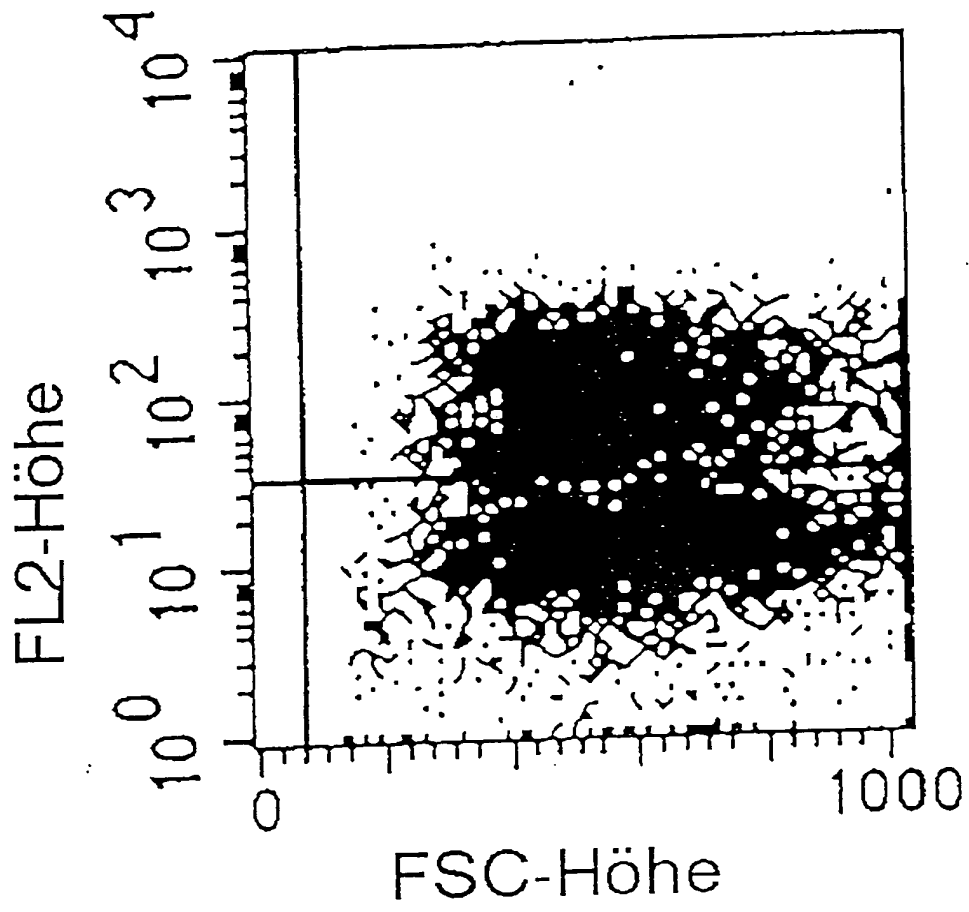


FIG. 2C



03.08.99

CCS

5/16

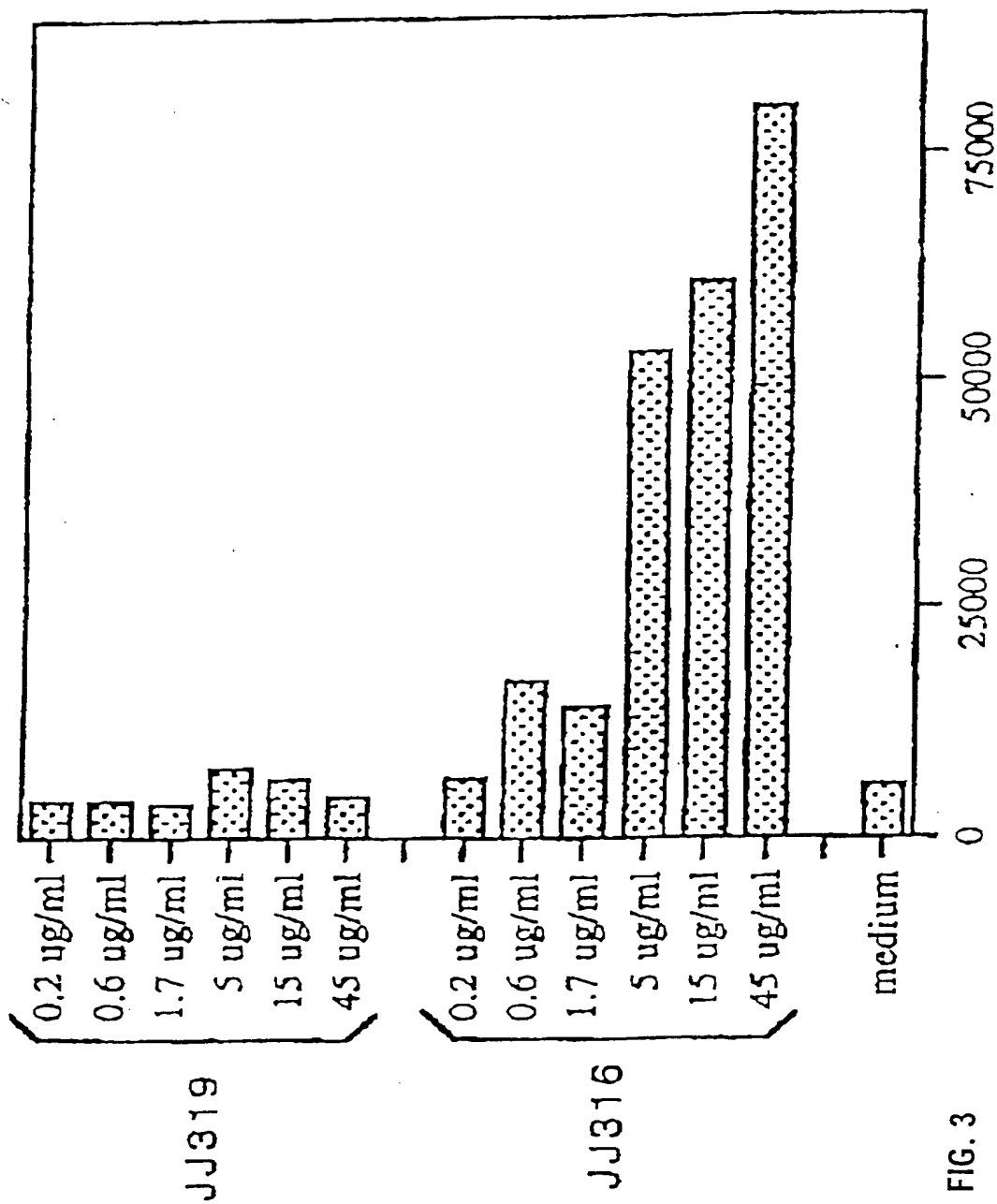


FIG. 3

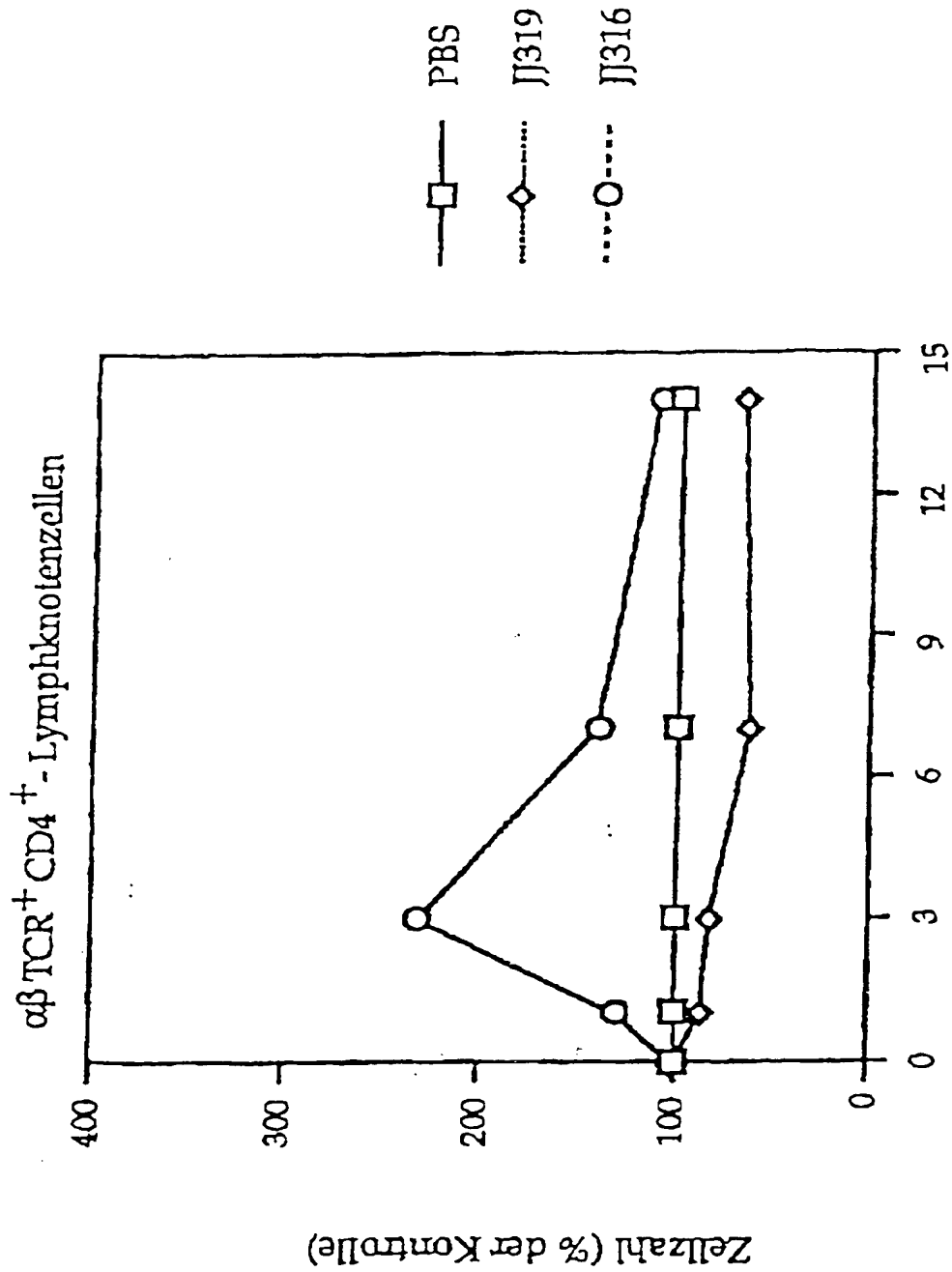


FIG. 4

Tage nach i.p. Injektion

7/16

FIG. 5a

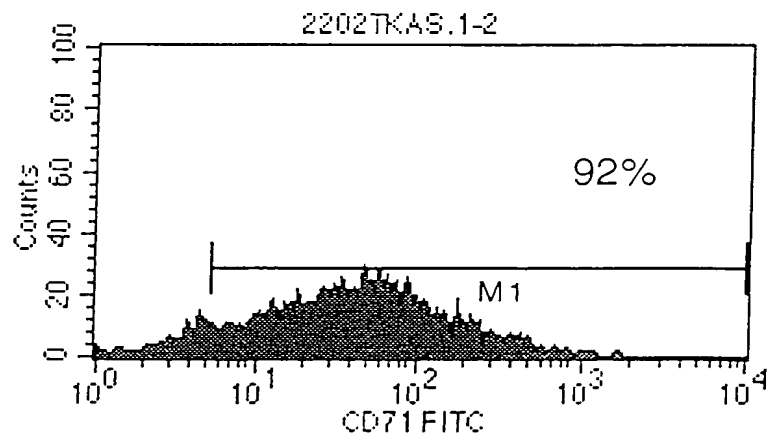
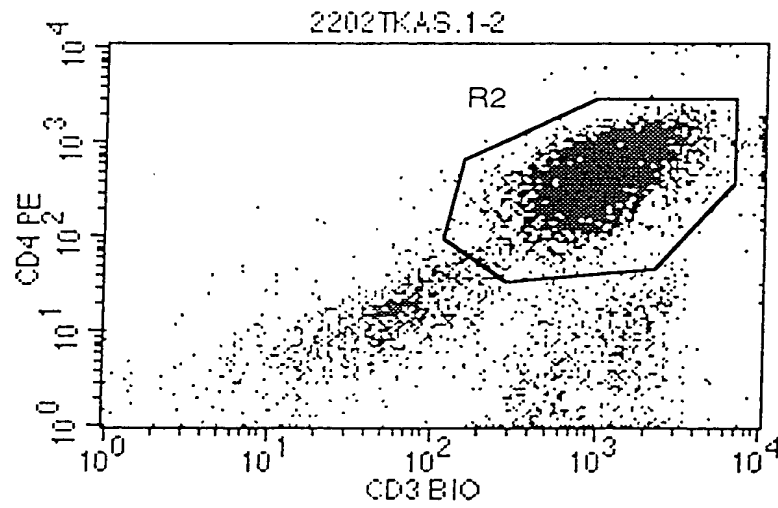


FIG. 5b

FIG. 6a

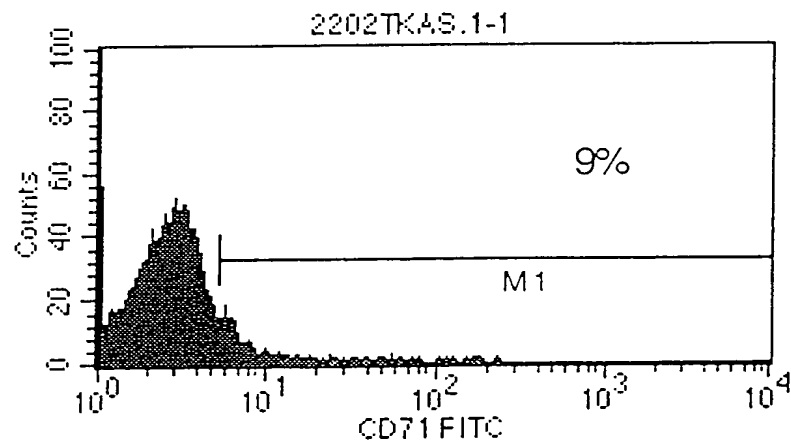
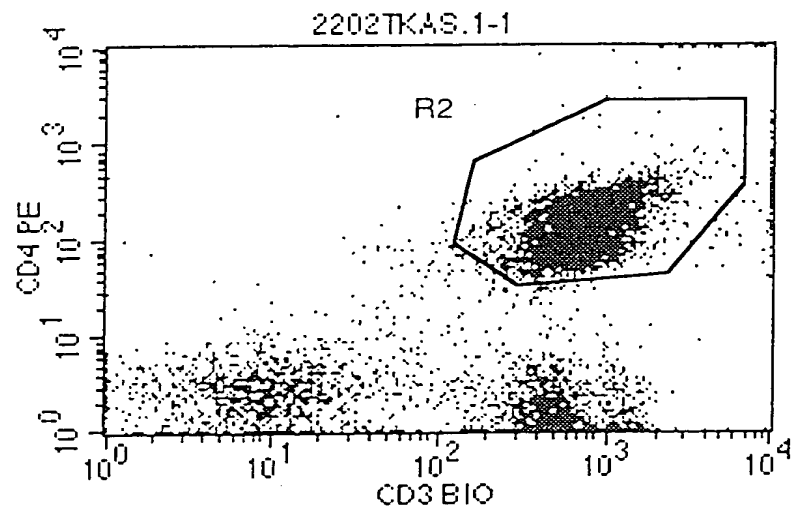


FIG. 6b

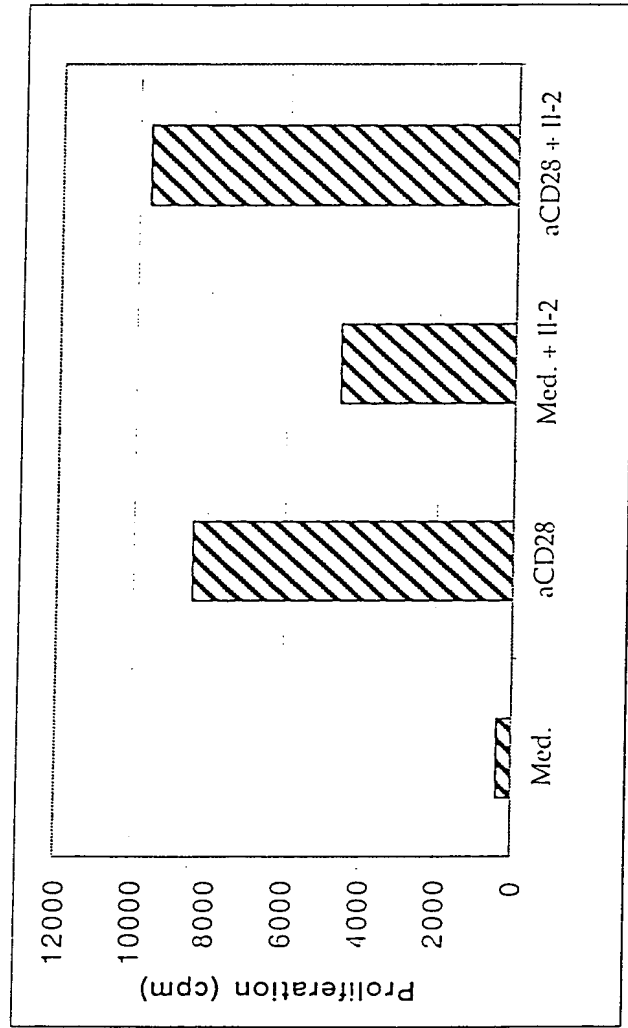


FIG. 7

01.03.99

Sc

FIG. 8A

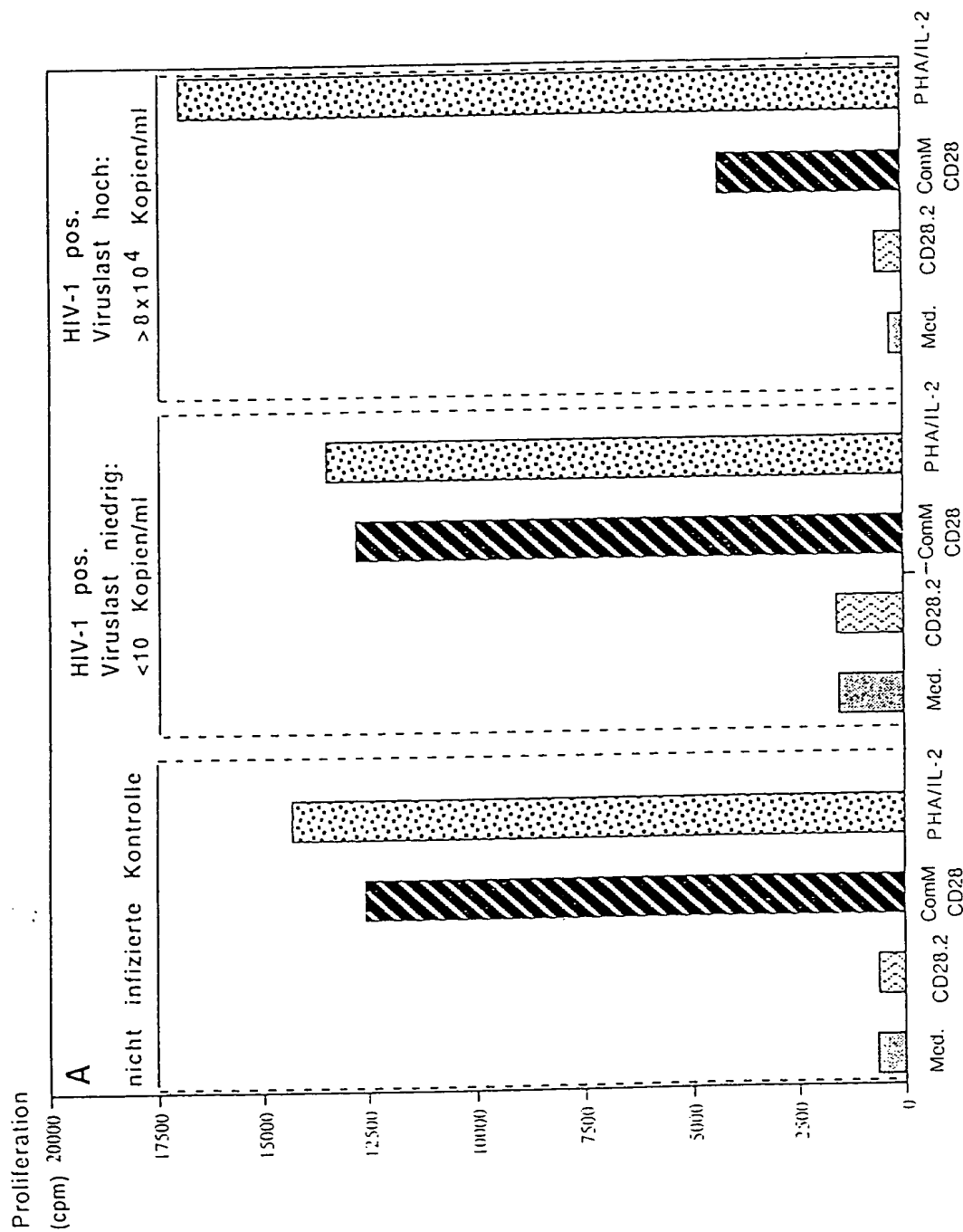
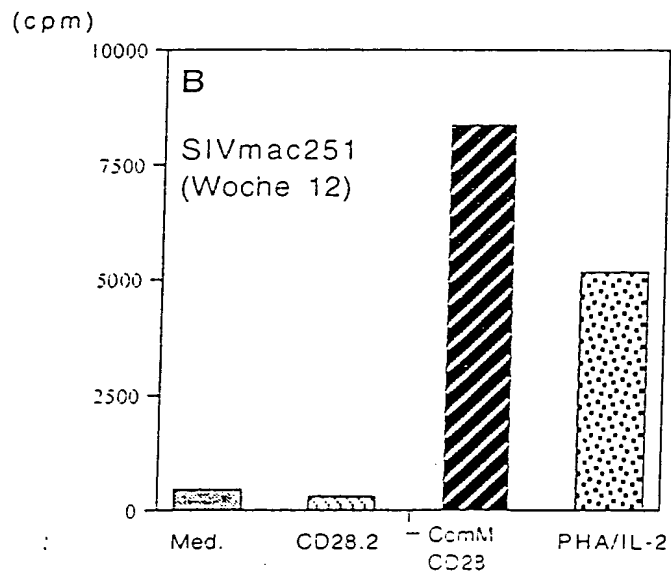


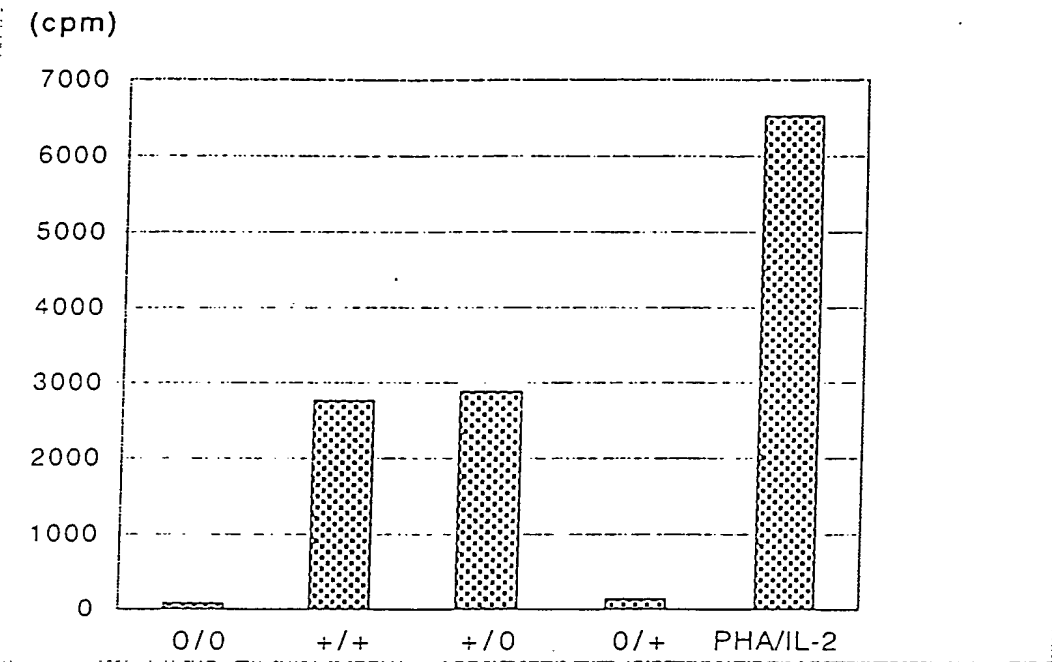


FIG. 8B



12/16

Proliferation



0/0	/	/
+/+	Anti-CD28	HAART
+/0	Anti-CD28	/
0/+	/	HAART

FIG. 9

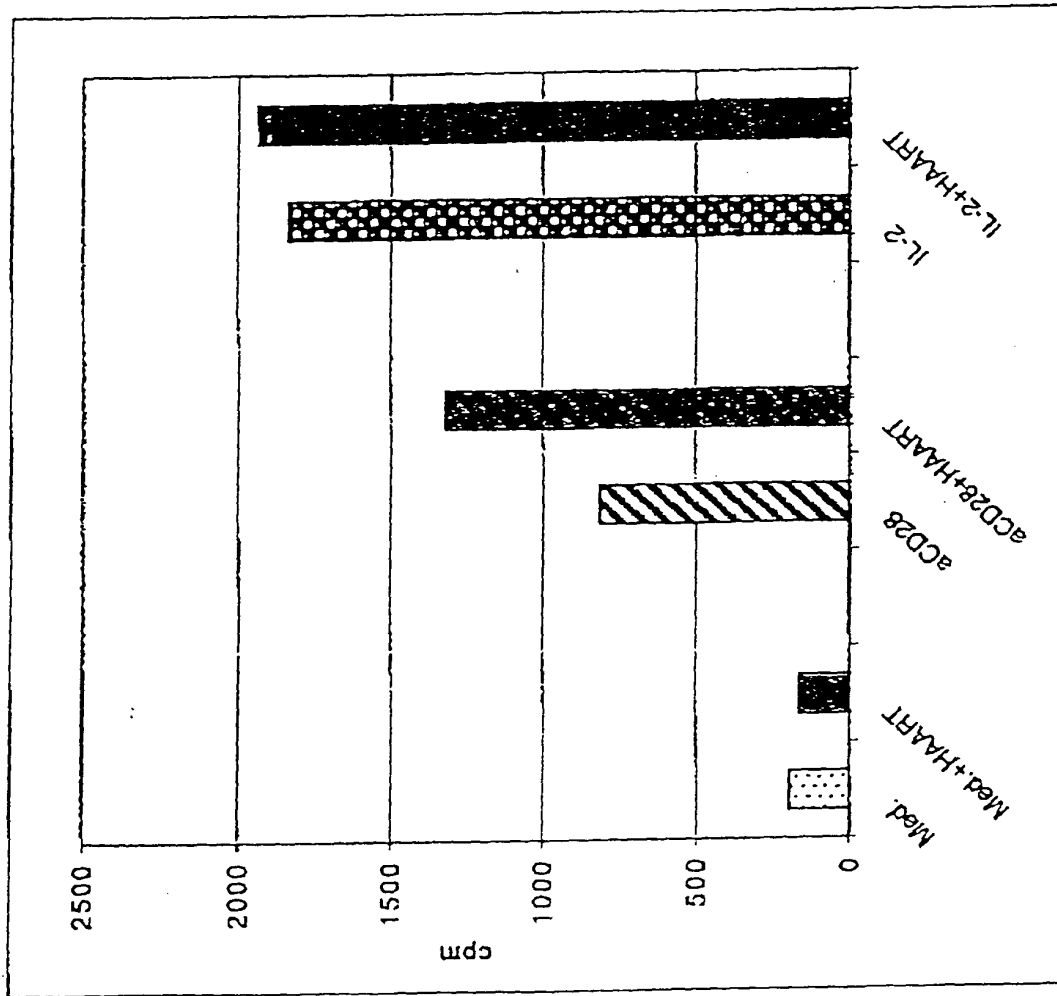
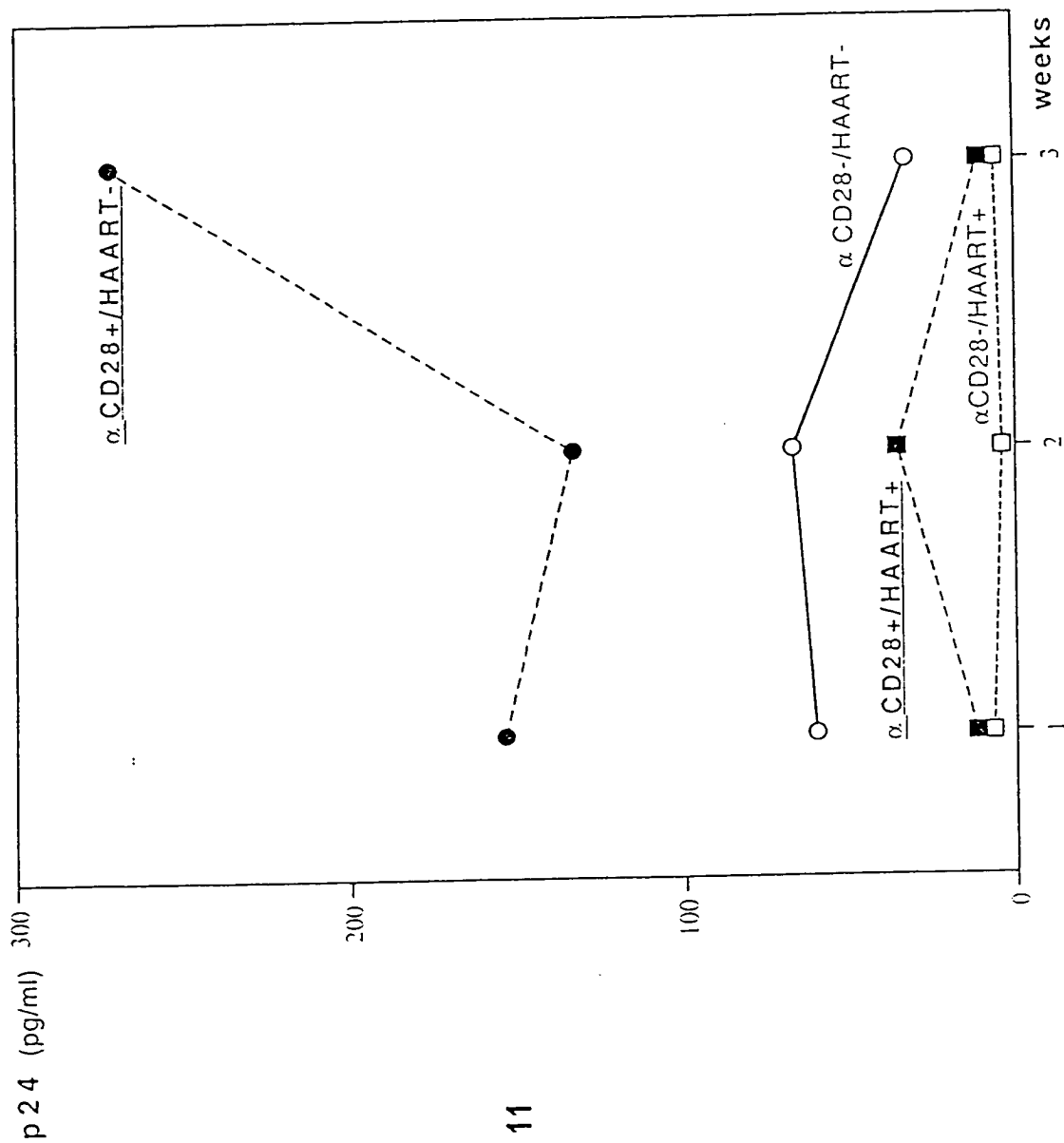
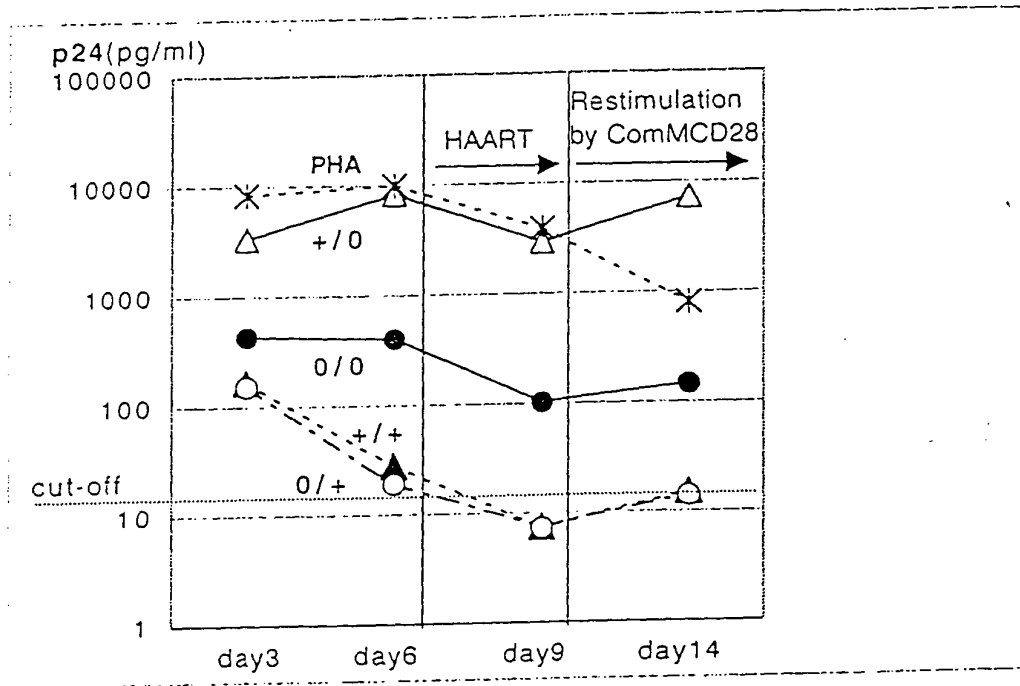


FIG. 10





0/0	/	/
+/+	Anti-CD28	HAART
+/0	Anti-CD28	/
0/+	/	HAART

FIG. 12

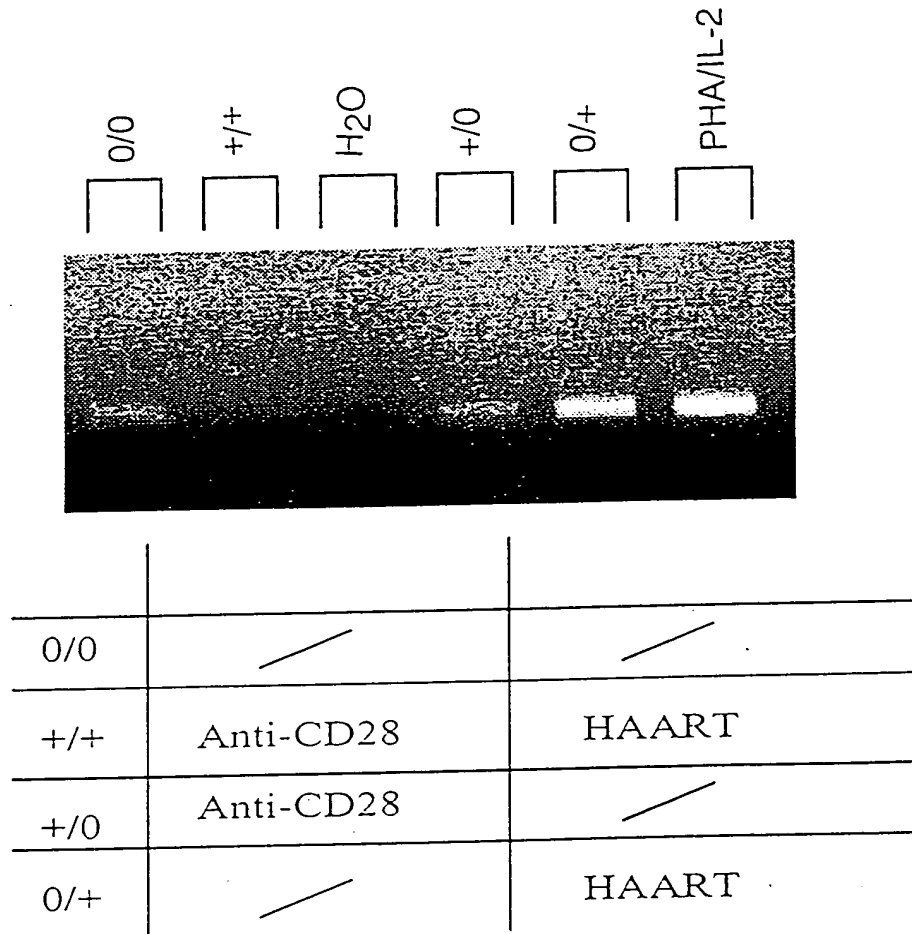


FIG. 13